

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů

Štěpána Boukalová

**Úloha konzervovaných
aminokyselinových zbytků v S4/S4-S5
oblasti vaniloidních TRP receptorů**

Diplomová práce

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury. Konstrukty potřebné pro experimenty vytvořili Ing. Jan Teisinger a Mrg. Lenka Maršáková. Na vyhodnocení výsledů se podílela má školitelka RNDr. Viktorie Vlachová. Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 26110).

V Praze dne: 22. 4. 2010

Štěpána Boukalová

Ráda bych především poděkovala své školitelce dr. Viktorii Vlachové za vstřícnost a veškerou pomoc. Velice si vážím pozornosti, kterou mi věnuje, díky níž mohu vcelku samostatně pracovat na velmi zajímavých projektech. Dále bych ráda poděkovala ing. Teisingerovi a Lence Maršákové za pomoc s přípravou konstruktů. Velký dík patří i ing. Ivanu Dittertovi za ochotu při řešení technických problémů, Magdě Kuntošové za veškerý laboratorní servis a Filipu Touškovi za vytváření příjemné pracovní atmosféry.

Abstrakt

TRPV1 receptor, iontový kanál z podrodiny vaniloidních TRP receptorů, je tetramerní proteinový komplex, jehož každá podjednotka obsahuje šest transmembránových segmentů S1-S6. Tento receptor je aktivován řadou podnětů schopných vyvolat bolest, jako jsou kapsaicin, protony, zvýšená teplota okolního prostředí a depolarizační napětí. Mechanismus napěťové citlivosti TRPV1 receptoru není doposud znám. Předpokládá se, že součástí napěťového senzoru tvoří nabitě aminokyselinové zbytky v S4 transmembránovém segmentu a v S4-S5 spojovací klíčky. Abychom určili, která rezidua se podílejí na napěťové citlivosti TRPV1 receptoru a příbuzných vaniloidních receptorů, vytvořili jsme mutantní formy těchto iontových kanálů se zaměněnými konzervovanými aminokyselinovými zbytky v S4/S4-S5 oblasti. Velká část námi vytvořených mutantních TRPV1 receptorů byla poškozena vzhledem k napěťové, chemické a/nebo teplotní aktivaci. Lokalizovali jsme dvě rezidua (R557 a D576), která by potenciálně mohla tvořit součást napěťového senzoru TRPV1. Prokázali jsme funkční interakci dvojic reziduí R557-E570 a D576-R579 u TRPV1 receptoru. Určili jsme aminokyselinový zbytek (K571), který specificky podmiňuje citlivost TRPV1 k 2-aminoetoxydifenylborátu (2-APB), společnému aktivátoru TRPV1, TRPV2 a TRPV3 iontových kanálů. I přes vysokou konzervovanost S4-S5 oblasti homologické mutace u TRPV2 a TRPV3 receptorů nevedly k poškození funkce těchto iontových kanálů. Z našich výsledků vyplývá, že význam oblasti S4 segmentu a S4-S5 spojovací klíčky v regulaci vrátkování se liší mezi jednotlivými typy vaniloidních TRP receptorů.

Abstract

The vanilloid transient receptor potential channel TRPV1 is a tetrameric six-transmembrane segment (S1-S6) channel that can be synergistically activated by various proalgesic agents such as capsaicin, protons, heat or highly depolarizing voltages. In TRPV1 channel, the charged residues in the S4 region and intracellular S4-S5 linker have been proposed to constitute a part of a voltage sensor that acts in concert with other stimuli to regulate channel activation. Molecular basis of this gating event are poorly understood. We mutated charged residues all along the S4 and the S4-S5 linker of TRPV1 and related vanilloid receptors to identify potential voltage-sensing residues. The functionality of most of the TRPV1 mutants was altered with respect to voltage, capsaicin, heat and/or their interactions. We identified two amino acid residues (R557 and D576) that could potentially constitute part of TRPV1 voltage sensor. The non-functional charge-reversing mutations R557E and R579E were partially rescued by charge-swapping mutations R557E/E570R and D576R/R579E, indicating that electrostatic interactions contribute to allosteric coupling between the voltage-, temperature- and capsaicin-dependent activation mechanisms. The mutant K571E was normal in all aspects of TRPV1 activation except for 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), a common activator of TRPV1, TRPV2 and TRPV3, revealing the specific role of K571 in chemical sensitivity. Surprisingly, substitutions at homologous residues in TRPV2 or TRPV3 were without effect on temperature, voltage and 2-APB induced activity. Thus, the charged residues in S4 and the S4-S5 linker, despite their highly conserved nature, regulate differentially the temperature, voltage and chemical gating among the TRPV channels.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	7
2	ÚVOD.....	8
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
3.1	TEPLOCITLIVÉ TRP IONTOVÉ KANÁLY	9
3.2	STRUKTURA TEPLOCITLIVÝCH TRP RECEPTORŮ	14
3.2.1	<i>Transmembránová oblast.....</i>	<i>15</i>
3.2.2	<i>N-koncová oblast</i>	<i>20</i>
3.2.3	<i>C-koncová oblast</i>	<i>21</i>
3.3	MODULÁRNÍ CHARAKTER TRP RECEPTORŮ A MODEL Y AKTIVACE	22
4	CÍLE PRÁCE.....	24
5	POUŽITÉ METODY.....	25
5.1	BUNĚČNÉ KULTURY A TRANSFEKCE	25
5.2	PŘÍPRAVA MUTANTNÍCH RECEPTORŮ	25
5.3	ELEKTROFYZIOLOGICKÁ MĚŘENÍ	26
5.4	EXPERIMENTÁLNÍ ROZTOKY	27
5.5	HODNOCENÍ ZÁZNAMŮ A STATISTICKÁ ANALÝZA	28
6	VÝSLEDKY	33
6.1	S4-S5 OBLAST VANILOIDNÍCH TRP IONTOVÝCH KANÁLŮ	33
6.2	NAPĚŤOVÁ CITLIVOST MUTANTNÍCH FOREM TRPV1 RECEPTORU.....	35
6.3	DYNAMICKÉ VLASTNOSTI ODPOVĚDI NA KAPSAICIN U MUTANTNÍCH FOREM TRPV1	38
6.4	CITLIVOST MUTANTNÍCH TRPV1 RECEPTORŮ NA 2-APB.....	42
6.5	TEPLOTNÍ CITLIVOST MUTANTNÍCH FOREM TRPV1	42
6.6	MUTACE HOMOLOGICKÝCH AMINOKYSELIN U TRPV2 A TRPV3 RECEPTORŮ. 45	
6.7	FUNKČNÍ VLASTNOSTI TRPV1 S BODOVOU ZÁMĚNOU G563S.....	48
7	DISKUZE.....	49
7.1	HLEDÁNÍ NAPĚŤOVÉHO SENZORU TRPV1 RECEPTORU	49
7.2	ÚLOHA S4/S4-S5 OBLASTI VE VRÁTKOVÁNÍ TRPV1 KANÁLU.....	50
7.3	INTERAKCE AMINOKYSELINOVÝCH ZBYTKŮ V S4/S4-S5 OBLASTI TRPV1	52
7.4	K571 PODMIŇUJE CITLIVOST TRPV1 K 2-APB	54
7.5	ODLIŠNÁ ÚLOHA KONZERVOVANÝCH AMINOKYSELINOVÝCH ZBYTKŮ V S4/S4-S5 OBLASTI TRPV1, TRPV2 A TRPV3 RECEPTORŮ.....	54
8	ZÁVĚR.....	56
9	CITOVANÁ LITERATURA	57

1 Seznam zkratek

2-APB	2-aminoetoxydifenylborát
ANOVA	analysis of variance analýza variance, statistický test
ATP	adenosintrifosfát
C-konec	karboxylový konec proteinu
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimetyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRG	dorsal root ganglion ganglia zadních kořenů míšních
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina
HEK293T	human embryonic kidney cell line linie lidských embryonálních ledvinných buněk
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid 4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazin ethansulfonová kyselina
Kaps	kapsaicin
MATra	Magnet-assisted Transfection
N-konec	aminový konec proteinu
NGF	nerve growth factor
PCR	polymerase chain reaction polymerázová řetězová reakce
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bifosfát
PKC	proteinkináza C
PVP	sekvence prolin – valin – prolin
Q ₁₀	teplotní koeficient
S1-S6	označení šesti transmembránových segmentů podjednotky iontového kanálu
THC	Δ^9 -tetrahydrokanabinol
TRP	transient receptor potential
V _{1/2}	hodnota membránového potenciálu při kterém dosahuje proudová odpověď buňky při napěťové stimulaci poloviny svého maxima
wild-type	přírozená forma receptoru běžně zastoupená u populace nositelů
z	vrátkovací náboj

2 Úvod

K velkým objevům v oblasti studia mechanismů nocicepce patří identifikace molekulárního senzoru bolestivého tepla – TRPV1 receptoru. Po více jak deseti letech intenzivního výzkumu je zřejmé, že tento iontový kanál se podílí na vzniku řady patologických bolestivých stavů. Poznatky týkající se TRPV1 iontového kanálu přiměly velké množství farmaceutických společností k zahájení výzkumných programů ve snaze identifikovat antagonisty tohoto receptoru, které by mohly sloužit jako analgetické látky. V současné době se na některých z objevených modulátorů TRPV1 receptoru provádějí klinické testy a v budoucnu by se mohly používat pro léčení různých typů bolesti (migréna, dentální, neuropatická a osteoartritická bolest) (pro přehled viz Szallasi et al., 2007). V případě, že lépe pochopíme, jak struktura TRPV1 receptoru určuje jeho funkční vlastnosti, budeme moci cíleně zaměřit vývoj nových analgetik, které budou mít optimální vlastnosti a minimum vedlejších účinků.

Předložená diplomová práce přispívá k objasnění strukturně-funkčních znaků TRPV1 receptoru a příbuzných iontových kanálů. Je zaměřena na charakterizaci významu S4 transmembránového segmentu a S4-S5 spojovací klíčky. Tato oblast je u receptorů vaniloidní poskupiny TRP iontových kanálů vysoce konzervovaná, přesto její funkční význam v aktivaci dosud nebyl v literatuře popsán. Tato práce přináší nové poznatky týkající se napěťové, chemické i teplotní citlivosti TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptorů. Naše výsledky přispívají k objasnění úlohy S4/S4-S5 oblasti ve vrátkování vaniloidních TRP receptorů.

3 Literární přehled

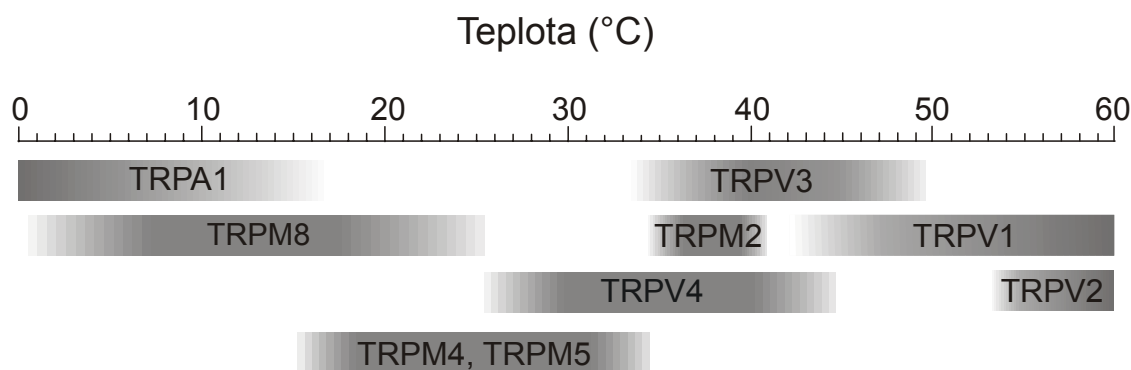
TRP receptory tvoří početnou skupinu příbuzných iontových kanálů, které se podílejí na nejrůznějších fyziologických funkcích u živočichů. Jsou exprimovány téměř ve všech typech tkání, přičemž funkce mnoha TRP receptorů není doposud známa. Zatím nejlépe popsána je jejich úloha v transdukcii senzorických podnětů, ať už tepelných, chemických nebo mechanických. Poprvé byl zástupce rodiny TRP receptorů popsán u mutantního kmene octomilky obecné. Takzvaný *trp* (transient receptor potential) kmen se vyznačuje poškozenou transdukcí světla – při světelné stimulaci u něj dochází k přechodné odpovědi fotoreceptoru, kdežto u zdravých jedinců odpověď fotoreceptoru přetrvává po dobu délky podnětu (Cosens a Manning, 1969). Bylo zjištěno, že defekt je způsoben mutací iontového kanálu, který zprostředkovává depolarizaci membrány buňky v odpověď na světlo (Montell et al., 1985; Vaca et al., 1994). Podle homologické sekvence DNA bylo následně identifikováno několik desítek příbuzných receptorů u různých živočišných druhů, které byly rozděleny do sedmi podrodin – TRPC (classical, canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPN (NOMP).

3.1 Teplocitlivé TRP iontové kanály

Nejlépe charakterizovaným iontovým kanálem z rodiny TRP je zástupce podrodiny vaniloidních receptorů – TRPV1. Tento proteinový komplex je exprimován na malých a středně velkých senzorických neuronech i v některých oblastech centrální nervové soustavy (Szallasi et al., 1995; Caterina et al., 1997; Guo et al., 1999; Mezey et al., 2000). TRPV1 je iontový kanál propustný pro vápenaté i sodné ionty, který je aktivován zvýšením teploty okolního prostředí nad asi 42 °C a některými chemickými podněty, například vaniloidními látkami (kapsaicinem, resiniferatoxinem), produkty lipoxygenas či protony (pH extracelulárního prostředí pod 6,8). Činnost tohoto receptoru je modulována napětím. Při silné depolarizaci buňky (asi nad +20 mV) dochází k otevření TRPV1 iontového kanálu (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Hwang et al., 2000). TRPV1 receptor je považován za jednu z nejvýznamnějších transdukčních molekul, která zprostředkovává odpověď organismu na bolestivé podněty. Již před vlastním objevem TRPV1 iontového kanálu byla citlivost

ke kapsaicinu, dráždivé látce obsažené v pálivých paprikách, jednou z vlastností charakterizující nociceptivní sensorické neurony. Mimo vnímání akutních bolestivých stimulů se TRPV1 významně uplatňuje při vzniku zánětlivé a neuropatické hyperalgie (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Christoph et al., 2007). Mediátory zánětu, jako jsou bradykinin, nervový růstový faktor (NGF) a prostaglandin E₂, zvyšují citlivost TRPV1 receptoru a zprostředkovávají tak vznik zánětlivé a neuropatické hyperalgie (Nicholas et al., 1999; Premkumar a Ahern, 2000; Chuang et al., 2001; Sugiura et al., 2002; Moriyama et al., 2005). TRPV1 iontový kanál tedy má význam nejen při vnímání akutních nociceptivních podnětů, ale uplatňuje se i při patologických bolestivých stavech vyvolaných poškozením tkáně či zánětem (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Christoph et al., 2007). V současné době probíhají klinické testy několika agonistů a antagonistů TRPV1 receptoru. Tyto látky by v budoucnu mohly sloužit jako vhodná analgetika pro léčení různých typů bolesti (pro přehled viz Wong a Gavva, 2008).

TRPV1 receptor je nejlépe prozkoumaným zástupcem takzvaných termo-TRP receptorů, jejichž charakteristickou vlastností je schopnost reagovat na změnu teploty prostředí. Do této skupiny TRP receptorů se řadí představitelé tří podrodin – vaniloidní (TRPV1 – TRPV4), melastatinové (TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM8) a ankyrinové (TRPA1). Prahová teplota aktivace vaniloidních termo-TRP receptorů stanovená v heterologním expresním systému se pohybuje v rozmezí od mírného tepla až po teploty, které je již možné považovat za bolestivé (> 42 °C) (obrázek 3.1). TRPM8 a TRPA1 receptory jsou naopak aktivovány snížením teploty extracelulárního prostředí s prahovou teplotou 26 °C a 17 °C. TRPM2, TRPM4 a TRPM5 receptory nejsou exprimovány na teplocitlivých sensorických neuronech a pravděpodobně neslouží přímo k transdukcii tepelných podnětů, teplota spíše moduluje jejich aktivitu (Talavera et al., 2005; Togashi et al., 2006). Například TRPM5 receptory jsou exprimovány na basolaterální straně některých chuťových buněk, kde jsou aktivovány v odpověď na sladké, hořké a umami podněty v rámci G-proteinové signální dráhy (Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003). Se stoupající teplotou vzrůstá aktivita TRPM5 receptoru, což může být molekulárním podkladem známého jevu, kdy je vjem sladké chuti zesílen zvýšenou teplotou (Talavera et al., 2005).



Obrázek 3.1 Aktivita některých TRP receptorů je modulována teplem. Rozpětí teplot, při kterých jsou termo-TRP receptory aktivní. TRPV1 a TRPV2 iontové kanály reagují na bolestivé teplo. TRPV3 a TRPV4 jsou exprimovány na keratinocytech a jsou stimulovány zvýšenou teplotou prostředí. Jejich aktivita je pravděpodobně zvýšena již za klidové tělesné teploty. TRPA1 a TRPM8 receptory reagují na nízké teploty. TRPM2, TRPM4 a TRPM5 iontové kanály zřejmě nemají význam při transdukcii podnětů v termosenzitivních nervových drahách, jejich činnost je však také modulována tepelnými podněty.

Aktivační práh TRPV2 receptoru je vyšší než u TRPV1 (asi 52 °C u potkaního podtypu) (Caterina et al., 1999). TRPV2 je exprimován na středně velkých sensorických neuronech, ale také v tkáních mimo nervovou soustavu (například plicích, slezině, střevech, žírných buňkách) (Caterina et al., 1999; Kashiba et al., 2004; Stokes et al., 2004). Předpokládá se, že TRPV2 spolu s TRPV1 receptory zastávají funkci detektorů bolestivého tepla. Tato domněnka byla zpochybněna experimenty provedenými na pokusných myších s vyřazeným *Trpv2* genem, u nichž nebyla prokázána poškozená termosenzitivita (Park et al., 2008). Lidský TRPV2 iontový kanál se ve svých aktivačních vlastnostech liší od hlodavčích podtypů. Nepeer a kol. publikovali v roce 2007 práci zabývající se porovnáním citlivosti myších, potkaních a lidských TRPV2 receptorů k chemickým agonistům a tepelné stimulaci. U lidského podtypu nebylo možné vyvolat odpověď receptoru teplotou do 53 °C ani chemickým aktivátorem 2-aminoetoxydifenylborátem (2-APB). Systematickou záměnou cytoplazmatických konců myšího a lidského TRPV2 bylo molekulárně biologickými technikami prokázáno, že k 2-APB citlivosti myšího ortologu je nezbytná přítomnost distálních částí obou konců receptoru. Přesná molekulární podstata rozdílných vlastností lidského a potkaního TRPV2 receptoru však nebyla doposud odhalena (Juvin et al., 2007; Nepeer et al., 2007).

TRPV3 a TRPV4 receptory jsou exprimovány především na keratinocytech pokožky, kde pravděpodobně přispívají k detekci tepelných podnětů (Guler et al., 2002; Peier et al., 2002b; Chung et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Chung et al., 2004b; Moqrich et al., 2005). Otázkou je, jak se informace přenáší z keratinocytů na sensorické

neurony. Kandidátem na signální molekulu umožňující komunikaci buněk pokožky a neuronů je ATP. Bylo zjištěno, že se při mechanické i tepelné stimulaci ATP uvolňuje z keratinocytů kultivovaných spolu s DRG neurony a dokáže tyto neurony aktivovat prostřednictvím purinergních receptorů (Koizumi et al., 2004; Mandadi et al., 2009). TRPV3 a TRPV4 receptory jsou aktivovány nižšími teplotami než TRPV1 receptor. TRPV4 iontový kanál je pravděpodobně částečně aktivován již za klidové tělesné teploty (Guler et al., 2002; Peier et al., 2002b; Chung et al., 2003). Pokusy na „knockout“ zvířatech prokázaly význam TRPV3 a TRPV4 receptorů v detekci nociceptivních tepelných podnětů i ve vnímání nebolestivého tepla (Todaka et al., 2004; Moqrich et al., 2005). TRPV4 receptor je mimo tepelné a chemické stimuly aktivován také sníženou osmolaritou extracelulárního prostředí (Liedtke et al., 2000; Strotmann et al., 2000; Wissenbach et al., 2000). Předpokládá se, že schopnost reagovat na změny osmolarity by mohla být vlastností mechanoreceptorů, neboť v hypo- či hypertonickém prostředí dochází k deformaci buňky. Některé studie prokázaly, že se TRPV4 receptor podílí na detekci nejen osmotických, ale i mechanických podnětů v ledvinách a močovém měchýři (Gevaert et al., 2007; Wu et al., 2007). TRP receptory tedy mimo tepelné a chemické stimuly dokáží zprostředkovat odpověď i na mechanické podněty.

Vnímavost ke sníženým teplotám prostředí, ale i k látkám s chladivým účinkem, jako jsou mentol a icilin, zprostředkovává iontový kanál z podrodiny melastatinových TRP receptorů – TRPM8. V heterologním expresním systému se aktivační práh tohoto proteinového komplexu pohybuje okolo 26 °C a s klesající teplotou roste proudová odpověď TRPM8 receptoru (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). *Trpm8* „knockout“ myši se vyznačují sníženou rozlišovací schopností teplot v oblasti mírného chladu a poškozenou citlivostí k teplotám, které za normálních okolností vyvolávají bolest (<17 °C) (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Z pokusů provedených na zvířatech s vyřazeným *Trpm8* genem vyplývá, že se TRPM8 receptor podílí na vzniku neuropatické a zánětlivé chladové alodynie, ale zprostředkovává zároveň i analgetický účinek chladu (Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007).

Jediný zástupce podrodiny ankyrinových TRP receptorů, TRPA1, je exprimován na nervových zakončeních nociceptivních C-vláken (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005). Tento iontový kanál je aktivován širokým spektrem dráždivých látek a zánětlivých mediátorů, jako jsou akrylaldehyd, cinnamaldehyd (hlavní složka skořicové silice) (Bandell et al., 2004), allylisoithiokyanát (pálivá látka obsažená

v semínkách hořčice a kořenu křene) (Jordt et al., 2004), allicin z česneku a cibule (Bautista et al., 2006) nebo peroxid vodíku (Andersson et al., 2008). Přestože jsou aktivátory TRPA1 receptoru strukturně velmi rozmanité, většina se vyznačuje elektrofilními vlastnostmi a zpravidla mají schopnost reagovat s thiolovými skupinami. Je pravděpodobné, že tyto látky aktivují TRPA1 receptor skrze kovalentní modifikaci cysteinových popřípadě lysinových aminokyselinových zbytků umístěných na intracelulární N-koncové části iontového kanálu (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007; Andersson et al., 2008; Takahashi et al., 2008). Existují ale i jiné aktivátory, které patrně stimulují TRPA1 receptor tradičním způsobem vazby ligandu na receptor. Mezi ně se řadí například Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC), karvakrol (látku obsaženou v dobromysli) a mentol (Jordt et al., 2004; Xu et al., 2006; Xiao et al., 2008a). TRPA1 iontový kanál reaguje také na zvýšenou intracelulární hladinu vápenatých iontů vzestupem pravděpodobnosti otevření (Jordt et al., 2004; Zurborg et al., 2007). Předpokládá se, že TRPA1 je efektorovým iontovým kanálem některých G-proteinových signálních drah, které se účastní senzitivace sensorických neuronů. Mediátory zánětu tedy dokáží aktivovat TRPA1 receptor nejen přímo – kovalentní modifikací proteinového komplexu (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 a prostaglandin A_2), ale i nepřímo, aktivací G-proteinových signálních drah a následným zvýšením intracelulární hladiny vápenatých iontů (bradykinin) (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006; Andersson et al., 2008; Takahashi et al., 2008; Taylor-Clark et al., 2008).

Chladová aktivace TRPA1 receptoru byla často zpochybňována. Již první studie zabývající se elektrofyzilogickou charakteristikou heterologně exprimovaných iontových kanálů se lišily ve svých závěrech ohledně teplotní aktivace TRPA1 receptoru. Jedna výzkumná skupina pozorovala specifické proudové odpovědi při aplikaci roztoku o teplotě nižší než 17 °C (tato teplota koreluje s bolestivým prahem u člověka) (Story et al., 2003; Bandell et al., 2004), zatímco jiné laboratoře chladovou aktivaci TRPA1 receptoru nezaznamenaly (Jordt et al., 2004; Nagata et al., 2005). Stejně rozporuplné se ukázaly být pokusy se zvířaty s vyřazeným *Trpa1* genem (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006). Jednou z hypotéz je, že TRPA1 receptor není aktivován chladem přímo, ale že reaguje na vzrůst koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky zprostředkovaný jiným transdukčním mechanismem (Zurborg et al., 2007). Nejnovější práce však dokazuje, že snížené teploty přímo aktivují TRPA1 receptor i v nepřítomnosti vápenatých iontů. Chladem vyvolaná aktivita receptoru byla

pozorována při měření v konfiguraci vytrženého terčíku, tedy i mimo buněčný kontext (Karashima et al., 2009).

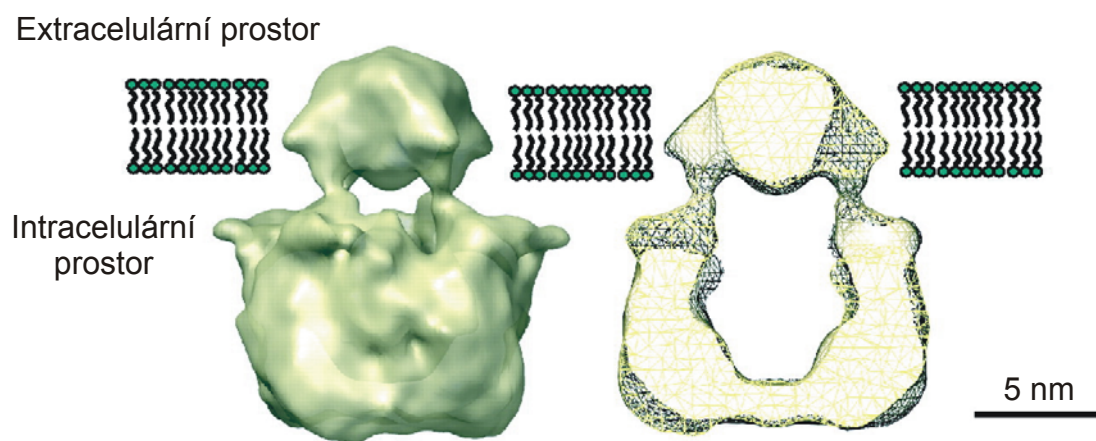
Charakteristickým znakem termosenzitivních TRP receptorů je jejich polymodální způsob aktivace – reagují nejen na teplotní změny, ale mohou fungovat i jako ligandem otvírané iontové kanály a jejich činnost je modulována napětím. Jednotlivé podněty působí synergisticky, odpověď receptoru na kombinaci více podnětů je vyšší než součet účinku jednotlivých stimulů. Aplikace chemických agonistů snižuje práh pro teplotní i napěťovou aktivaci TRP receptorů. Teplocitlivé TRP iontové kanály tedy působí jako transdukční molekuly senzoričkových podnětů integrující různé fyzikální i chemické stimuly. TRPV1 a TRPA1 receptory se specificky účastní akutních, ale pravděpodobně i chronických nociceptivních procesů. Studium těchto iontových kanálů snad v budoucnu umožní použití nových metod pro léčení bolestivých stavů.

3.2 Struktura teplocitlivých TRP receptorů

Funkční vlastnosti iontových kanálů, jako jsou vrátkování, selektivita a propustnost pro ionty, nebo interakce s jinými molekulami, jsou určeny jejich strukturou. Poznání stavby receptoru či enzymu na atomové úrovni je důležité nejen k pochopení jejich funkčních znaků, ale umožní i vývoj nových léčebných látek, které budou optimálně modulovat činnost těchto proteinů. Doposud nejvíce využívanou metodou určování struktury proteinů s vysokým rozlišením je rentgenová krystalografie. Iontové kanály jako integrální membránové proteiny je velmi komplikované získat v krystalické podobě v dostatečném množství. Hlavním omezením je jejich nestabilita ve vodném prostředí a nemožnost získat dostatečně čistý a koncentrovaný vzorek (Lundstrom, 2004). Molekulové uspořádání iontových kanálů lze modelovat na podkladě již známých rentgenových struktur příbuzných transmembránových proteinů. Takto získaná informace však nemusí odpovídat skutečnosti a je důležité ověřovat realističnost modelu pokusy zaměřenými na vztah struktury a funkce iontových kanálů.

Žádný z TRP receptorů se doposud nepodařilo krystalizovat vcelku. Rentgenová struktura byla určena pouze u některých intracelulárních oblastí izolované od zbytku receptoru (Jin et al., 2006; Lishko et al., 2007; Fujiwara a Minor, 2008; Phelps et al., 2008). Třídímenzionální rekonstrukce TRP receptorů v plné délce se však podařilo vytvořit pomocí jednočásticové elektronové mikroskopie. Zobrazení získaná touto

metodou mají nižší rozlišení ($> 6 \text{ \AA}$) a není možné z nich usuzovat na přesný průběh polypeptidového řetězce iontového kanálu (Gaudet, 2008). Rekonstrukce TRPV1 receptoru s rozlišením 19 \AA potvrdila předpokládané tetramerní uspořádání tohoto proteinového komplexu. V analogii s rentgenovou strukturou napěťově ovládaného draselného iontového kanálu Kv1.2 (Long et al., 2005) je u TRPV1 možné rozlišit dvě separátní části – intracelulární a membránovou doménu receptoru. Intracelulární oblast je propojena s membránovou pouze pomocí tenkých spojů a obsahuje N- i C- koncovou část proteinu (obrázek 3.2) (Moiseenkova-Bell et al., 2008).



Obrázek 3.2 Zobrazení struktury TRPV1 receptoru získané metodou jednočásticové elektronové mikroskopie. TRPV1 receptor je tetramerní proteinový komplex složený ze dvou strukturálních částí – transmembránové a intracelulární. Intracelulární doména je tvořena N- a C- konci jednotlivých podjednotek a ve svém nitru má pravděpodobně relativně velkou dutinu. Rozlišení 19 \AA . Převzato z (Moiseenkova-Bell et al., 2008).

3.2.1 Transmembránová oblast

3.2.1.1 Senzor napětí a S4-S5 klička

Z bioinformaticky zaměřených analýz vyplývá, že transmembránová oblast jednotlivých podjednotek TRP receptorů je tvořena šesti segmenty S1 – S6. U napěťově ovládaných kanálů se tradičně oblast pátého a šestého transmembránového úseku s krátkou propojující hydrofobní kličkou označuje za pórovou doménu, která obklopuje centrální kanálek a strukturálně se podílí na vrátkování iontového kanálu. S1-S4 oblast je pak nazývána doménou senzoru napětí reagující na změny membránového potenciálu buňky. Zdá se, že alespoň u některých typů iontových kanálů ovládaných napětím jsou obě části na sobě funkčně nezávislé (Lu et al., 2001; Elinder et al., 2007). Senzor napětí je tvořen převážně čtvrtým transmembránovým segmentem, který u napěťově

ovládaných kanálů obsahuje několik vysoce konzervovaných kladně nabitých aminokyselinových zbytků od sebe oddělených dvěma až třemi nenabitými rezidui. S4 segment reaguje na změnu potenciálu buňky změnou konformace. Tento signál je přenášen z domény senzoru napětí na pórovou doménu prostřednictvím S4-S5 spojovací kličky. Existuje několik modelů, které popisují způsob pohybu S4 segmentu. Doposud není jasné, který z nich se nejvíce blíží skutečnosti (Borjesson a Elinder, 2008).

TRP receptory mají mnohem nižší napětřovou citlivost než klasické napětřově ovládané iontové kanály, což odpovídá nižšímu zastoupení kladně nabitých aminokyselinových zbytků ve čtvrtém transmembránovém segmentu – melastatinové TRP receptory mají v dané oblasti dva a vanilloidní podrodina pouze jeden argininový zbytek. Míru napětřové citlivosti lze stanovit pomocí hodnoty tzv. vrátkovacího náboje (z , gating charge), jenž vyjadřuje teoretický počet elementárních nábojů, které musí projít elektrickým polem membrány, aby se kanál otevřel. Tento pohyb náboje lze měřit jako vrátkovací proud. U napětřově ovládaných draselných kanálů je počet vrátkovacích nábojů asi 12, pohyb tří elementárních nábojů připadá na každou podjednotku (Borjesson a Elinder, 2008). U TRPV a TRPM receptorů je tato hodnota menší než jedna, což koreluje s jejich slabou napětřovou citlivostí (Brauchi et al., 2004; Nilius et al., 2005; Matta a Ahern, 2007).

Význam kladně nabitých aminokyselinových zbytků v S4 segmentu a přilehlé S4-S5 spojovací kličce byl studován na TRPM8 receptoru (Voets et al., 2007). Byly identifikovány aminokyseliny na dvou pozicích (R842 a K856), jejichž náhrada za nenabité alaninové zbytky vedla k snížení hodnoty vrátkovacího náboje, pravděpodobně tedy tvoří součást napětřového senzoru. Dohromady tato rezidua představují asi 50 – 70 % celkového vrátkovacího náboje. Aminokyselina K856 je umístěna v domnělé intracelulární kličce, která spojuje čtvrtý a pátý transmembránový segment. Zdá se, že daná oblast mimo S4 může přispívat k napětřové citlivosti TRPM8 kanálů. Neutralizační mutace R842A, K856A, ale i mutace dalších kladně nabitých reziduí, které se neprojevily změnou vrátkovacího náboje, se vyznačují pozměněnými odpověďmi na napětí, mentol a/nebo tepelné podněty. Oblast S4 a S4-S5 spojovací kličky má tedy širší význam při regulaci otevírání a zavírání kanálu.

Význam S4 a S4-S5 kličky v regulaci vrátkování TRP receptorů potvrzují i výsledky studie provedené na TRPV1 receptoru (Myers et al., 2008). Tato práce byla zaměřená na identifikaci mutantů, které vykazují spontánní aktivitu za klidových

podmínek bez přítomnosti agonistů. Mutace tří aminokyselinových zbytků v oblasti S4-S5 (Q560R, Q561R, M581T) se vyznačovaly zvýšeným bazálním proudem. Takto pozměněné TRPV1 receptory byly toxické pro buňky, které je exprimovaly, pravděpodobně z důvodu neustále zvýšené intracelulární hladiny vápenatých iontů.

Mutace v S4-S5 oblasti teplocitlivých TRP receptorů jsou genetickým podkladem některých fyziologických poruch savců. U spontánně bezsrstých kmenů hlodavců – DS-*Nh* myši a WBN/Kob-*Ht* potkanů – byla nalezena bodová záměna glycinu umístěného v předpokládané S4-S5 spojovací kličce TRPV3 receptoru. Takto mutovaný TRPV3 receptor má zvýšenou bazální aktivitu, což vede k porušení vápníkové homeostázy keratinocytů bezsrstých kmenů (Asakawa et al., 2006; Xiao et al., 2008b). Spontánní aktivita TRPV4 receptoru s mutací na cytoplazmatickém konci čtvrté nebo páté transmembránové domény (R594H, R616Q, V620I) je pravděpodobně podkladem poškozené funkce chondrocytů u lidí s některými typy kosterních dysplázií (Rock et al., 2008; Krakow et al., 2009).

3.2.1.2 Oblast póru

Pórová oblast iontových kanálů má dvě hlavní funkční části – selektivní filtr určující propustnost pro ionty a vrátka, umožňující otevírání a zavírání kanálu. U napěťově ovládaných draselných kanálů existují dvě hlavní hypotézy vrátkování. Především u prokaryotických typů receptorů pravděpodobně dochází k otevření kanálu rotací části S6 helixu v místě konzervovaného glycinového zbytku umístěného v blízkosti selektivního filtru. Touto rotací se od sebe oddálí intracelulární konce S6 helixů, čímž se stane vnitřní část póru přístupná pro ionty i jiné malé molekuly. U eukaryotických draselných kanálů aktivovaných napětím je pravděpodobnější model, ve kterém jsou vrátka tvořena konzervovanou oblastí se sekvencí prolin – valin – prolin (PVP). Ohyby S6 šroubovic čtyř podjednotek receptoru za klidového stavu neumožňují průchod iontů. Při aktivaci dochází k malé změně konformace proteinu v oblasti PVP, čímž dojde k otevření kanálu (pro přehled viz Elinder et al., 2007). Obecně lze tedy říci, že pro vrátkování kanálu je důležitá přítomnost strukturálního „pantu“, který umožní změny v uspořádání S6 helixu. Tento pant je zpravidla tvořen malými flexibilními aminokyselinami – glycinem či prolinem.

Předpokládá se, že obdobný mechanismus otevírání kanálu se uplatňuje i u TRP receptorů. U TRPA1 receptoru byla popsána funkční úloha prolinu umístěného v S6

oblasti, jehož záměna za rigidnější alanin vedla k silnému poškození aktivačních a deaktivčních vlastností iontového kanálu a pozměnila i propustnost pro vápenaté ionty. Náhrada za glycin funkci receptoru neovlivnila. Zdá se tedy, že daný prolinový aminokyselinový zbytek tvoří vrátkovací pant u TRPA1 receptoru (Benedikt et al., 2009).

Na rozdíl od TRPA1 receptoru, TRPV1 neobsahuje ve svém S6 segmentu flexibilní aminokyselinu, která by byla vhodným kandidátem na vrátkovací pant. Studie zaměřená na odhalení strukturních komponent vrátkovacího mechanismu odhalila dvě místa zúžení vnitřního póru TRPV1 receptoru. První zúžení umístěné blíž intracelulárnímu konci póru znemožňuje průchod velkých molekul. Druhá konstriktce, uložená hlouběji v póru, pravděpodobně uzavírá kanál pro ionty (Salazar et al., 2009). Tuto hypotézu potvrzuje i skutečnost, že mutace aminokyselinového zbytku uloženého v dané oblasti (Y671) vede k změnám v propustnosti pro vápenaté ionty (Mohapatra et al., 2003) a výrazným způsobem poškozuje aktivační vlastnosti TRPV1 receptoru (Susankova et al., 2007).

Extracelulární oblast pórové domény je klíčová pro teplotní citlivost vaniloidních TRP receptorů (Grandl et al., 2008; Yang et al., 2010). Mutace v této oblasti specificky poškodily odpovědi TRPV1 a TRPV3 receptorů na teplo, vlastnosti pozměněných TRPV iontových kanálů vzhledem k aktivaci jinými typy podnětů však nebyly narušeny. Fluorescenčními pokusy bylo prokázáno, že při stimulaci teplem dochází u TRPV1 receptoru k přiblížení částí pórové hlavice jednotlivých podjednotek, což pravděpodobně umožňuje otevření iontového kanálu. Při aktivaci chemickými a napěťovými podněty tato konformační změna nebyla pozorována.

3.2.1.3 Vazebná místa agonistů

Odlišná citlivost různých druhů organismů k chemickým aktivátorům TRP receptorů se stala klíčovou pro lokalizaci vazebných míst. Na rozdíl od hlodavců a člověka, jsou plazi, ptáci i někteří savci (králíci) necitliví ke kapsaicinu (Szallasi a Blumberg, 1999). Porovnání primární sekvence TRPV1 receptorů s rozdílnou senzitivitou umožnilo identifikovat vazebnou doménu pro kapsaicin, která zprostředkovává i vazby jiných agonistů. Aktivátory TRPV1 receptoru jsou lipofilní látky schopné procházet membránou (kapsaicin, resiniferatoxin obsažený v sukulentu *Euphorbia resinifera*, anandamid – endogenní aktivátor TRPV1). Vazebná kapsa

pro tyto látky je umístěna mezi třetím a čtvrtým transmembránovým segmentem. Mutace specifických aminokyselinových zbytků v dané oblasti vede ke ztrátě senzitivity potkaního podtypu TRPV1 receptoru. Záměna aminokyselinových zbytků podle vzoru hlodavčího TRPV1 umožní přenesení citlivosti k chemickým aktivátorům na ptačí či králičí podtyp. Je zajímavé, že chimérické TRPV2 a TRPV4 receptory s vloženým S2-S4 segmentem TRPV1 iontového kanálu jsou také schopny reagovat na aplikaci kapsaicinu proudovou odpovědí (Jordt a Julius, 2002; Gavva et al., 2004). Pozměněná citlivost na kapsaicin byla pozorována i při záměně specifických reziduí na N- a C- konci TRPV1 receptoru i v oblasti póru (Jung et al., 2002; Mohapatra et al., 2003). Tyto aminokyseliny se pravděpodobně nepodílejí na struktuře vazebného místa, ale alostericky modulují proces vazby ligandu či převod této informace na otevření kanálu.

Stejný přístup byl použit i při hledání vazebného místa pro icilin na TRPM8 receptoru. Chimérické a mutační pokusy s potkaním a ptačím podtypem TRPM8 receptoru, který je za normálního stavu necitlivý na icilin, umožnily lokalizaci vazebné kapsy do analogické pozice v membránové části iontového kanálu jako u TRPV1 receptoru (Chuang et al., 2004). Oblast mezi třetím a čtvrtým transmembránovým segmentem je určující také pro vazbu agonistů TRPV4 receptoru (Vriens et al., 2004; Vriens et al., 2007). Zdá se, že vazba ligandu do intramembránové oblasti iontového kanálu je společným mechanismem chemické aktivace teplocitlivých TRP receptorů. Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že v S2 a S4 oblasti TRPM8 byly nalezeny dva aminokyselinové zbytky, které podmiňují vazbu mentolu na receptor (Bandell et al., 2006; Voets et al., 2007).

2-aminoetoxydifenylborát (2-APB) je společným aktivátorem TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptorů a inhibuje TRPM8 iontové kanály (Hu et al., 2004; Chung et al., 2004a). Na intracelulární N-koncové části TRPV3 receptoru v blízkosti první transmembránové domény byl identifikován aminokyselinový zbytek specificky určující citlivost k 2-APB (H426). Náhrada této aminokyseliny za asparagin nepoškodila odpovědi TRPV3 na teplo ani na napětí, ale značně snížila citlivost k 2-APB. (Hu et al., 2009). Na homologní pozici u TRPV1 a TRPV2 receptorů se vyskytuje právě asparagin, tedy se zdá, že způsob aktivace pomocí 2-APB se u jednotlivých TRP receptorů liší. Experimenty provedené na TRPV2 ukázaly, že funkční vlastnosti receptoru vzhledem k aktivaci prostřednictvím 2-APB jsou určeny oběma intracelulárními konci (Juvín et al., 2007). Není jisté, zda je vazebné místo pro 2-APB umístěno na cytosolické části TRP receptorů. Tato oblast může pouze

alostericky modulovat vazebnou kapsu, či umožňovat správný převod vazby 2-APB na vrátkování kanálu.

3.2.2 N- koncová oblast

Na aminovém konci vaniloidních TRP receptorů a TRPA1 iontových kanálů se vyskytuje několik ankyrinových domén, sestávajících z konzervované sekvence asi 33 aminokyselin. Tyto domény lze najít v nejrůznějších proteinech a většinou zajišťují interakce s jinými makromolekulami (Mosavi et al., 2004). Předpokládá se, že stejnou funkci mají i ankyrinové domény u TRP receptorů.

Krystalová struktura izolované N-koncové oblasti s ankyrinovými repeticemi TRPV1 a TRPV2 receptorů je známa (Jin et al., 2006; McCleverty et al., 2006; Lishko et al., 2007). Struktura dané oblasti TRPV1 a TRPV2 je velmi podobná. Skládá se z šesti ankyrinových repetic, které jsou tvořeny antiparalelními šroubovicemi spojenými s β -vlásečkami. Na rozdíl od TRPV5 a TRPV6 receptorů se ankyrinové domény TRPV1 a TRPV2 nepodílejí na skládání proteinových komplexů do tetramerů (Erler et al., 2004; Chang et al., 2004). Nejlépe charakterizovaná je funkce TRPV1 ankyrinové oblasti. N-koncová část je důležitá pro regulaci zabudování funkčních TRPV1 iontových kanálů do plasmatické membrány prostřednictvím PKC signální dráhy (Morenilla-Palao et al., 2004). Zdá se, že ankyrinové domény TRPV1 mají také významnou úlohu v mechanismu desenzitizace receptorů. Po opakované aktivaci dochází u TRPV1 receptoru k snížení citlivosti na stimulační podněty (takzvaná tachyfyaxe), což je zprostředkováno vstupem vápenatých iontů do buňky (Koplas et al., 1997). Prakticky se tato skutečnost projevuje jako snižování amplitudy odpovědi při opakované stimulaci za podmínek, kdy jsou v extracelulárním roztoku přítomny vápenaté ionty. V klidovém stavu je na TRPV1 receptor navázán ATP, a to právě do oblasti ankyrinových domén. V závislosti na vstupu vápenatých iontů do buňky při aktivaci pravděpodobně dochází k odvázní ATP a navázání komplexu kalmomodulin- Ca^{2+} . Strukturální změny iontového kanálu doprovázející tuto výměnu podmiňují snížení citlivosti TRPV1 k aktivačním podnětům (Rosenbaum et al., 2004; Lishko et al., 2007). Bylo prokázáno, že se ATP váže také na ankyrinové domény TRPV3 a TRPV4 receptorů (Phelps et al., 2010). Na rozdíl od TRPV1 a TRPV4 iontových kanálů ATP snižuje citlivost TRPV3 na aktivační podněty.

3.2.3 C-koncová oblast

V proximální části karboxylového konce TRPC, TRPM a TRPV receptorů se vyskytuje vysoce konzervovaná oblast, tzv. TRP doména. U TRPV1 receptoru tato oblast umožňuje seskupení jednotlivých podjednotek do tetramerů (Garcia-Sanz et al., 2004). Předpokládá se, že TRP domény podjednotek TRPV1 receptoru jsou tvořeny α -šroubovicemi a mohou společně vytvářet coiled-coil struktury. U TRPM receptorů se na tetramerizaci také podílejí coiled-coil struktury, ale na rozdíl od TRPV1 receptoru jsou umístěny v distálnější části C-koncové oblasti iontového kanálu (Erler et al., 2006; Mei et al., 2006; Tsuruda et al., 2006).

V TRP boxu lze nalézt sekvenci šesti aminokyselin, které vykazují silnou míru homologie v rámci TRPC, TRPM a TRPV iontových kanálů. Tato oblast se dvěma kladně nabitými rezidui a invariantním tryptofanem je označována za TRP box a je klíčová pro správné vrátkování kanálu, přinejmenším TRPV1 receptorového komplexu. Mutace konzervovaných aminokyselinových zbytků v TRP boxu TRPV1 silně poškodily citlivost receptoru k aktivačním podnětům a zvýšily energetickou bariéru mezi otevřeným a zavřeným stavem iontového kanálu. Oblast TRP boxu pravděpodobně přispívá k nastavení aktivační energie pro otevření kanálu (Novakova-Tousova et al., 2007; Valente et al., 2008).

Aktivita některých teplocitlivých TRP receptorů je stimulována přítomností polárního lipidu fosfatidylinositolu-4,5-bifosfátu (PIP₂) (Liu a Liman, 2003; Liu a Qin, 2005; Rohacs et al., 2005; Zhang et al., 2005; Nilius et al., 2006; Stein et al., 2006). Je pravděpodobné, že polární část této látky interaguje s kladně nabitými aminokyselinovými zbytky v TRP doméně C-koncové části TRP receptorů (Rohacs et al., 2005; Brauchi et al., 2007). Deplece PIP₂ v membráně přispívá k snížení aktivity iontových kanálů, což je patrně jedním z mechanismů desenzitizace. Při aktivaci TRP receptorů dochází k vzrůstu intracelulární hladiny vápenatých iontů. Fosfolipáza C stimulovaná vápenatými ionty štěpí PIP₂ na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trifosfát. Toto snížení hladiny PIP₂ v membráně způsobí desenzitizaci receptoru (Rohacs et al., 2005).

Chimérní proteinové komplexy, u kterých byly zaměněny celé intracelulární C-koncové domény TRPV1 a TRPM8 receptorů, se vyznačují zajímavým fenotypem. TRPV1 receptor s karboxylovým koncem TRPM8 iontového kanálu si zachovává citlivost na kapsaicin, je však aktivován snížením teploty okolního prostředí. Podobně TRPM8 receptor s TRPV1 karboxylovým koncem je stimulován mentolem, ale

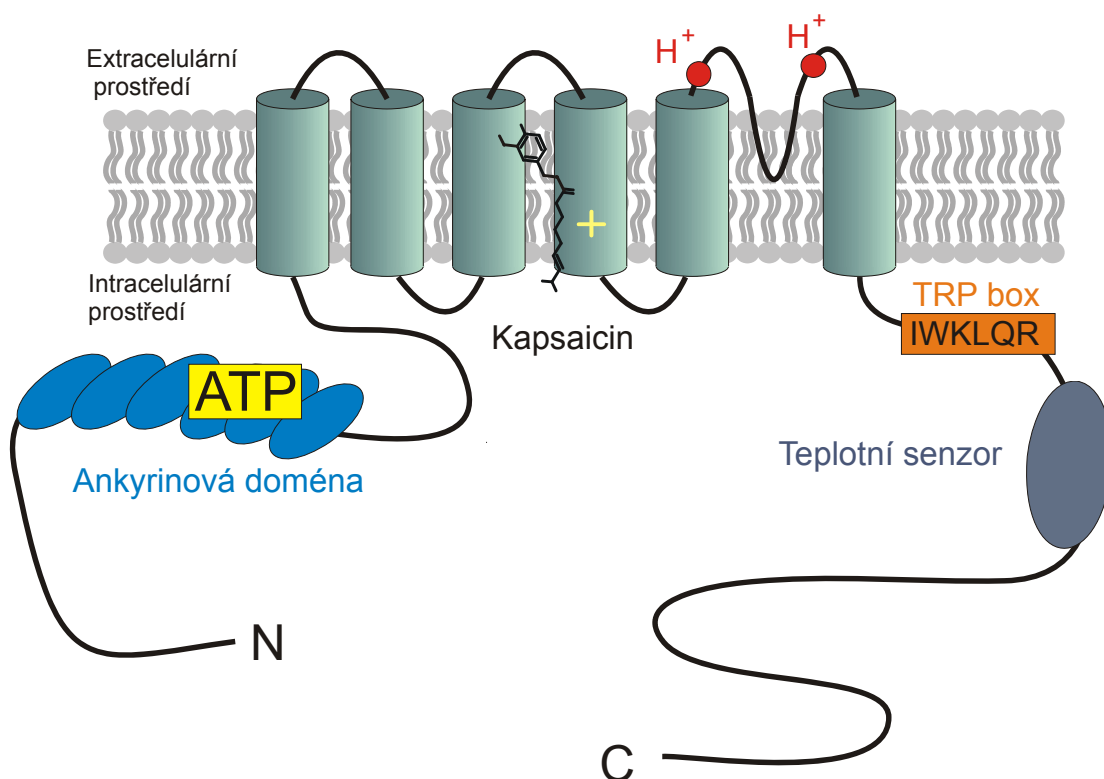
je citlivý na zvýšení teploty extracelulárního roztoku (Brauchi et al., 2006). Teplotní senzitivita je tedy pravděpodobně určena specifickou strukturou C-konce teplocitlivých TRP receptorů (Vlachova et al., 2003). Další experimenty prokázaly, že stačí náhrada krátké sekvence aminokyselin bezprostředně za TRP doménou, aby došlo k záměně fenotypu TRPV1 a TRPM8 receptorů vzhledem k teplotní aktivaci (Brauchi et al., 2007).

3.3 Modulární charakter TRP receptorů a modely aktivace

Experimenty s chimérickými receptory představují elegantní způsob, jak zkoumat vztah struktury a funkce. Z těchto pokusů vyplývá, že lze na teplocitlivé TRP iontové kanály pohlížet jako na modulární proteinové komplexy, přičemž jejich jednotlivé oblasti jsou specificky přizpůsobeny k vnímání určitých aktivačních a modulačních podnětů a jsou funkčně relativně nezávislé na zbytku receptoru (obrázek 3.3). Při přemístění do kontextu jiného TRP receptoru je taková doména schopna zprostředkovat otevření iontového kanálu v odpověď na aktivační stimul. Chemická citlivost TRP receptorů na hydrofobní látky je určena specifickou strukturou S2-S4 transmembránových segmentů. Je známo, že protony aktivují TRPV1 receptor skrze dva glutamátové zbytky umístěné ve spojovací klíče mezi S5 a S6 transmembránovým segmentem (Jordt et al., 2000). Teplotní citlivost a stimulační účinek fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu jsou zprostředkovány určitými sekvencemi aminokyselinových zbytků na karboxylovém konci TRPV1 a TRPM8 receptorů. U vaniloidních TRP receptorů je stimulace tepelnými podněty specificky podmíněna strukturou extracelulární části pórové domény. S4 transmembránový segment a S4-S5 spojovací klíčka alespoň z části určují napětovou senzitivitu TRPM8 receptoru.

Alosterický model aktivace teplocitlivých TRP receptorů předpokládá, že receptor má odlišné senzory pro různé stimulační podněty, které se mohou nezávisle na sobě vyskytovat v klidovém či aktivovaném stavu. Pokud se senzor nachází v aktivovaném stavu, pravděpodobnost otevření iontového kanálu je zvýšena. Stimulace senzoru napětí či teploty nedokáže plně aktivovat teplocitlivé TRP receptory. Stav s maximální pravděpodobností otevření TRP iontových kanálů nastává až při současné stimulaci receptoru teplotními a napětovými podněty, nebo při aplikaci vysoké koncentrace chemického aktivátoru (Brauchi et al., 2004; Latorre et al., 2007; Matta a Ahern, 2007; Yang et al., 2010).

Alternativní model aktivace teplocitlivých TRP receptorů předpokládá, že konečným podnětem, který otevírá iontový kanál, je napětí. Jakýkoli jiný aktivační stimul vede k posunu prahu pro napětěvou aktivaci do hodnot méně depolarizovaného membránového potenciálu, což může vést až k otevření iontového kanálu (Voets et al., 2004; Nilius et al., 2005). Tento model je podložen skutečností, že mutace aminokyselin, které tvoří napětěvý senzor TRPM8 receptoru, snížily citlivost proteinového komplexu na teplotní i chemické podněty (aplikaci mentolu) (Voets et al., 2007). Nedokáže však vysvětlit skutečnost, že napětí není plným agonistou TRPM8 receptoru.



Obrázek 3.3 Modulární charakter TRPV1 receptoru. Každá podjednotka TRP receptoru je složena ze šesti transmembránových segmentů a má intracelulárně lokalizované N- i C- konce. Na obrázku jsou vyznačeny oblasti, které specificky určují citlivost TRPV1 receptoru k aktivačním a modulačním podnětům. Oblasti TRP boxu proteinového komplexu vytváří coiled-coil struktury a umožňují tetramerní seskupení podjednotek. V S4 segmentu TRPV1 receptoru se vyskytuje jediný kladně nabitý aminokyselinový zbytek. Předpokládá se, že toto reziduum tvoří součást napětěvého čidla TRPV1.

4 Cíle práce

- **Pomocí bodových mutací lokalizovat aminokyselinové zbytky, které by mohly tvořit součást napěťového senzoru TRPV1 receptoru.**
- **Pokusit se určit úlohu vytypovaných aminokyselinových zbytků v S4-S5 spojovací kličce a přilehlé části S4 segmentu ve vrátkování TRPV1 iontového kanálu.**
- **Stanovit, do jaké míry je význam konzervovaných reziduí v S4/S4-S5 oblasti v regulaci vrátkování a napěťové citlivosti shodný pro TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptory.**

5 Použité metody

5.1 Buněčné kultury a transfekce

Pokusy jsme prováděli na linii lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293T, které byly pěstovány na miskách potažených poly-L-lyzinem za účelem zvýšení přilnavosti buněk k podložce. Kultivace probíhala v 5% roztoku fetálního hovězího séra v médiu OPTI-MEM (Life Technologies) v termostatu při 37 °C.

HEK293T buňky byly přechodně transfekovány rekombinantní cDNA kódující přirozený či mutantní typ iontového kanálu o koncentraci 200-600 ng na misku pomocí metody MATra (Magnet-assisted Transfection; IBA GmbH). Použili jsme následující konstrukty:

- (i) cDNA kódující TRPV1 iontový kanál potkaního podtypu nesený vektorem pcDNA3
- (ii) lidský TRPV2 receptor v pCMV6-XL5 vektoru
- (iii) lidský TRPV3 receptor v pcDNA5/FRT vektoru

Buňky byly současně transfekovány zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) neseným vektorem pQBI 25 o koncentraci 300 ng na misku za účelem identifikace úspěšně transfekovaných buněk. Pokusy jsme prováděli 24-48 hodin po transfekci. Pro každou experimentální skupinu byly použity přinejmenším dvě nezávislé transfekce.

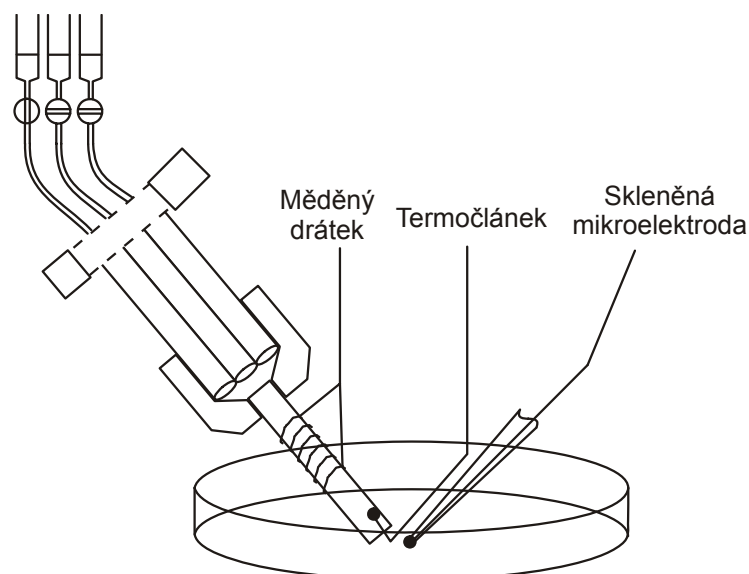
5.2 Příprava mutantních receptorů

Bodové mutace jsme vnášeli do přirozených sekvencí genů kódující jednotlivé typy iontových kanálů metodou PCR (polymerase chain reaction) za použití chemické soupravy QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Pro tvorbu dvojitéch mutantů jsme jako templát použili již pozměněnou DNA s vloženou bodovou mutací. Navržené mutační primery měly délku minimálně 30 nukleotidů s bodovou záměnou přibližně uprostřed. Primery byly navrhovány tak, aby obsahovaly co možná největší množství G-C párů. Oligonukleotidy byly syntetizovány u firmy VBC Genomics. Mutovanou DNA jsme namnožili v transformovaných bakteriích *E. coli*. Správnost mutantních konstruktů jsme ověřili sekvenací (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems).

5.3 Elektrofyziologická měření

Pro měření elektrických proudů protékajících membránou buněk, které heterologně exprimovaly TRP iontové kanály, jsme použili metodu terčíkového zámku v konfiguraci měření z celé buňky (*whole-cell patch clamp*). Proudů byly snímány pomocí zesilovače Axopatch 1-D v režimu napěťového zámku. V tomto režimu je membránový potenciál buňky udržován na námi zvolené konstantní hodnotě pomocí zpětnovazebné regulace a jsou snímány celkové elektrické proudy tekoucí přes membránu. Signál byl zaznamenáván pomocí programu pCLAMP9 (Molecular Devices). Pro odstínění vibrací byla měřicí aparatura umístěna na antivibrační stůl TMC (Technical Manufacturing Co.). K měření jsme používali skleněné mikropipety, které jsme získali vytažením z borosilikátových kapilár na horizontálním tahači (P-97, Sutter Instruments Co.). Po naplnění intracelulárním roztokem měly elektrody odpor 4-6 M Ω . Referenční elektrodu i elektrodu zajišťující kontakt mezi intracelulárním roztokem a zesilovačem tvořily stříbrné drátky potažené vrstvou AgCl. Sériový odpor jsme standardně kompenzovali na 40 %.

Pro aplikaci kontrolních roztoků a pokusných roztoků s rozpuštěnými aktivátory či inhibitory iontových kanálů byl použit aplikační systém vyvinutý v naší laboratoři (Dittert et al., 1998; 2006) (obrázek 5.1). Roztoky byly přiváděny do pokusné místičky sedmi teflonovými kapilárami ústícími do společné skleněné vývodní kapiláry, okolo které byl omotán izolovaný měděný drátek. Tento systém umožňuje ohřívání procházející tekutiny na definovanou teplotu (do 60 °C) rozžhavením měděného drátku. V ústí kapiláry, které jsme při měření kladli do vzdálenosti asi 100 μm od buňky, je umístěn termočlánek zaznamenávající teplotu protékajících roztoků.



Obrázek 5.1 Schematické znázornění aplikačního systému. Aplikační systém tvoří svazek sedmi teflonových trubiček napojených na nádoby s experimentálními roztoky. Trubičky ústí do společné skleněné kapiláry, kolem které je omotán měděný drátek. V ústí kapiláry je umístěn termočlánek zaznamenávající teplotu procházejících roztoků.

5.4 Experimentální roztoky

Složení intracelulárního roztoku (mM): Cs-glukono- δ -lakton 125, CsCl 15, EGTA 5, HEPES 10, CaCl₂ 0,5, MgATP 2, pH jsme upravovali pomocí CsOH na hodnotu 7,3. Osmolarita intracelulárního roztoku byla 286 mOsm.

Složení extracelulárního roztoku (mM): NaCl 160, HEPES 10, glukóza 10, KCl 2,5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, pH jsme upravovali pomocí NaOH na hodnotu 7,3. Osmolarita extracelulárního roztoku byla 316 mOsm.

Aktivátory a inhibitory iontových kanálů byly rozpouštěny v extracelulárním roztoku v den pokusu. Používali jsme předem připravené zásobní roztoky: 1M roztok 2-APB v DMSO, 0,01M roztok rutheniové červeni v destilované vodě, 0,1M roztok kapsaicinu v etanolu, ze kterého byl následně vytvářen sekundární zásobní roztok v destilované vodě o koncentraci kapsaicinu 0,001 M.

Všechny roztoky byly skladovány v chladu. Chemikálie byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich.

5.5 Hodnocení záznamů a statistická analýza

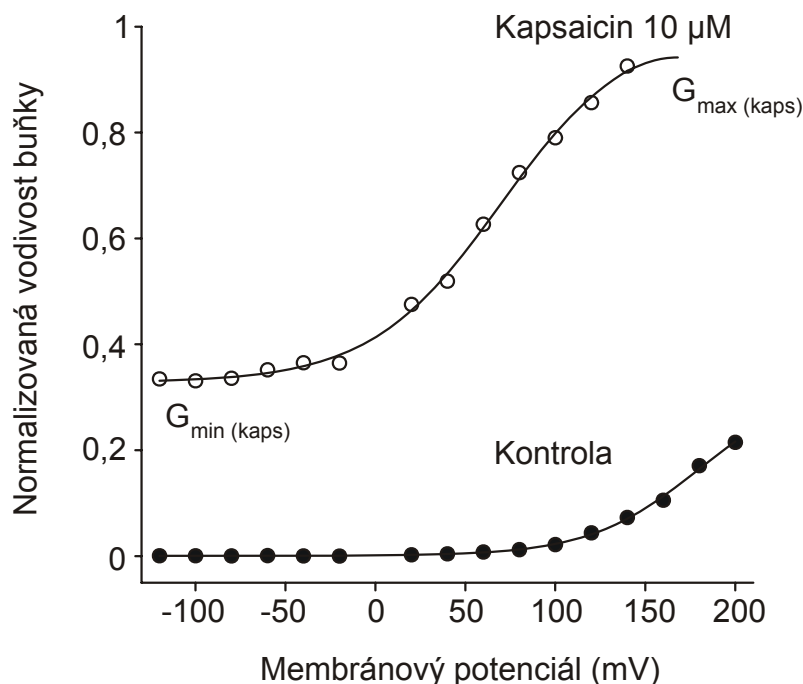
Všechna data byla analyzována pomocí programu pCLAMP 9.2 (Molecular Devices).

(i) Napěťová aktivace: Vlastnosti mutantních a přirozených receptorů vzhledem k napěťové aktivaci byly studovány pomocí 20 mV napěťových skoků o délce trvání 100 ms s minimální a maximální hodnotou membránového potenciálu -120 mV a $+200$ mV nejprve v kontrolním roztoku a poté v přítomnosti saturující koncentrace agonisty ($10 \mu\text{M}$ kapsaicin). Zaznamenávali jsme hodnoty proudových odpovědí buněk po dosažení rovnovážného stavu. Po vydělení takto získaných proudů příslušnou hodnotou membránového potenciálu, od které jsme odečetli reverzní potenciál buňky, jsme získali závislost vodivosti buňky na napětí (obrázek 5.2). Danou závislost jsme proložili Boltzmanovou funkcí:

$$G = \frac{G_{\max} - G_{\min}}{1 + \exp\left(-\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})\right)} + G_{\min}$$

kde G_{\max} je maximální dosažitelná vodivost, G_{\min} je minimální dosažitelná vodivost buňky, z je vrátkovací náboj (tzv. gating charge), F představuje Faradayovu konstantu ($F = 96\,485$ C/mol), V je napětí, $V_{1/2}$ je napětí, při kterém vodivost dosahuje poloviční hodnoty svého maxima, R je univerzální plynová konstanta ($R = 8,314$ J/(K·mol)) a T je absolutní teplota. Získaná hodnota z (gating charge) představuje dolní odhad celkového počtu nábojů, které jsou součástí proteinového komplexu iontového kanálu a jež se vlivem změny elektrického pole membrány přesunují. Protože TRPV1 kanál je otevírán depolarizací membránového potenciálu, proces otevírání zahrnuje přesun negativně nabitých částí proteinu směrem dovnitř buňky a/nebo pozitivních nábojů směrem ven z buňky. Přímou tedy vypovídá o napěťové citlivosti iontových kanálů. Změny v hodnotě $V_{1/2}$ mohou odrážet buďto změny v citlivosti k napětí, nebo jsou projevem poškozeného vrátkovacího mechanismu iontového kanálu.

Pro zhodnocení napěťově nezávislé komponenty aktivace vyvolané kapsaicinem jsme určovali poměr mezi minimální a maximální hodnotou vodivosti buňky měřené v přítomnosti $10 \mu\text{M}$ kapsaicinu. Minimální vodivost byla aproximována hodnotou vodivosti na -120 mV.



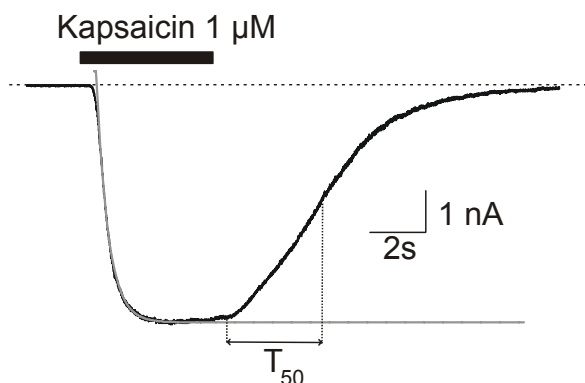
Obrázek 5.2 Hodnocení napětové závislosti TRPV1 receptoru. Vodivosti buňky v kontrolních podmínkách a při aplikaci 10 μM kapsaicinu vynesené v závislosti na hodnotě membránového potenciálu a normalizované vůči maximální dosažitelné vodivosti buňky v přítomnosti 10 μM kapsaicinu.

(ii) Chemická aktivace: Pro zhodnocení dynamiky aktivace TRPV1 receptoru vyvolané chemickým agonistou jsme měřili odpovědi buněk, jejichž membránový potenciál byl udržován na hodnotě -70 mV, na aplikaci 1 μM kapsaicinu. Časový průběh nástupu odpovědi jsme prokládali jednoduchou exponenciální funkcí:

$$A(t) = A_{\infty} \cdot (1 - e^{-t/\tau})$$

kde $A(t)$ je amplituda odpovědi v čase t , A_{∞} je amplituda odpovědi v čase $t = \infty$ (maximální amplituda), τ je časová konstanta určující, v jakém čase vzroste amplituda odpovědi na 63 % ($100 - 100/e$) maximální amplitudy (obrázek 5.3).

Odmývací fázi kapsaicinové odpovědi většinou nelze proložit jednoduchou exponenciální funkcí. Pro zhodnocení rychlosti deaktivace jsme tedy určovali takzvanou hodnotu T_{50} – čas potřebný k snížení amplitudy na polovinu.



Obrázek 5.3 Hodnocení rychlosti nástupu odpovědi. Aktivační fáze odpovědi na aplikaci 1 μM kapsaicinu byla proložena jednoduchou exponenciální funkcí. Při vyhodnocování rychlosti deaktivace jsme stanovovali hodnotu T_{50} , tj. doba, za kterou klesne amplituda odpovědi na polovinu.

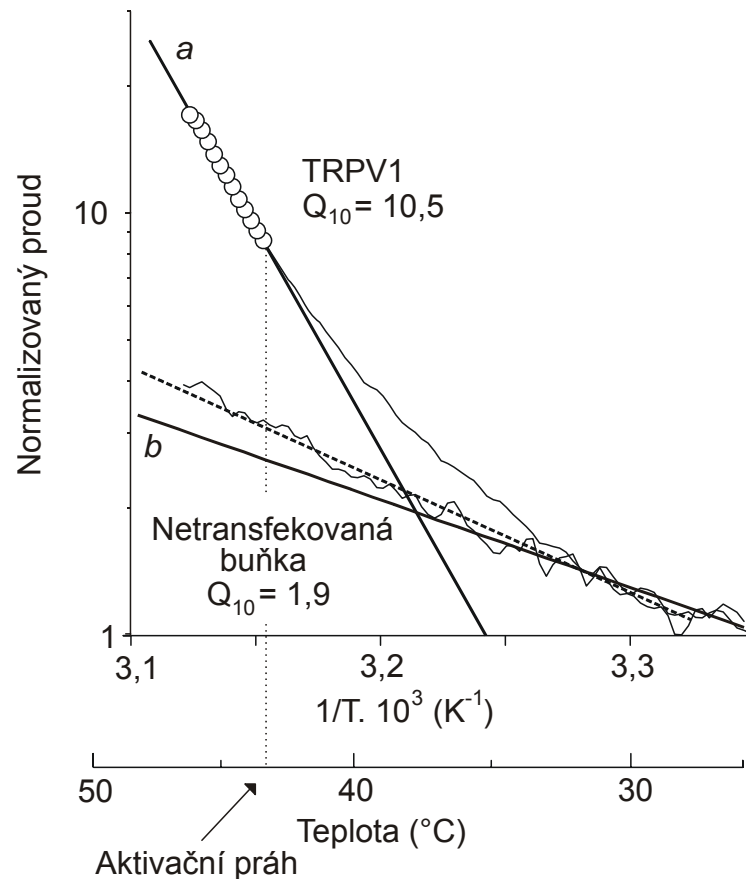
U konstruktů, jež nebylo možné aktivovat kapsaicinem při membránovém potenciálu -70 mV, ale u kterých jsme pozorovali proudy vyvolané aplikací agonisty na pozitivních membránových potenciálech, jsme pro zhodnocení dynamiky odpovědi použili protokol sestávající z lineárních zvýšení potenciálu z -70 mV na $+100$ mV aplikovaných každé dvě sekundy. Měřili jsme amplitudy proudových odpovědí buněk na $+90$ mV v kontrolních podmínkách, během 6 s aplikace agonisty v koncentraci 10 μM a následně při odmyvání kapsaicinu.

(iii) Aktivace teplem: Teplotní závislost TRP receptorů jsme stanovili za pomoci přesné regulace teploty experimentálních roztoků, které omývaly měřené buňky. Teplota roztoků byla lineárně zvyšována s maximálním přírůstkem 14 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$. Maximální dosažená teplota byla přizpůsobena známým aktivačním vlastnostem jednotlivých typů TRP receptorů. Průběhy odpovědí rostoucí fáze teplotního protokolu byly vyneseny v logaritmickém měřítku v závislosti na převrácené hodnotě absolutní teploty (tzv. Arrheniovské vynesení, obrázek 5.4). Výsledná funkce byla aproximována v oblasti nejvyšších teplot přímkou (přímka *a*, po částech lineární regrese metoda za použití programu SigmaPlot 10, korelační koeficient > 0.99). Přímka *a* odpovídá specifické exponenciální fázi aktivace TRP receptorů. Přímka *b* koreluje s první fází odpovědi, kdy teploty nedosahují prahové hodnoty aktivace. V této oblasti teplot ještě nedochází k aktivaci TRP receptorů. Pozorované membránové proudy jsou nespecifické, lze je zaznamenat i u buněk, které neobsahují teplotcitlivé iontové kanály. Teplotní práh aktivace pro jednotlivé buňky jsme určili jako teplotu při které přestává být Arrheniovská závislost lineární. Ze sklonu přímek lze odhadnout zdánlivou

aktivační energii děje v daném stavu (E_z). Teplotní koeficient Q_{10}^1 jsme určili dle vztahu:

$$Q_{10} = \exp\left(\frac{\Delta T \cdot E_z}{R \cdot T_1 \cdot T_2}\right)$$

kde R je univerzální plynová konstanta, $\Delta T = 10$ K, E_z je zdánlivá aktivační energie, T_1 a T_2 odpovídají hraničním hodnotám teplot, mezi kterými je Arrheniovska závislost lineární. Teplotní koeficient charakterizující teplotní závislost vodivosti iontových kanálů, které nejsou specificky aktivované teplem, dosahuje hodnoty přibližně 2. Při zvýšení teploty o 10 °C dojde u těchto kanálů k přibližně dvojnásobnému nárůstu vodivosti. Iontové kanály, u kterých Q_{10} přesahuje hodnotu 2, lze považovat za teplotně citlivé.



Obrázek 5.4 Stanovení teplotního koeficientu Q_{10} a prahové teploty pro aktivaci. Arrheniovské vynesení proudových odpovědí netransfekovaných buněk a buněk exprimujících TRPV1 receptory při stimulaci teplenými podněty. Přímký *a* a *b* představují lineární aproximace specifické a nespecifické fáze aktivace buněk obsahujících TRPV1. Čárkovaná čára značí lineární aproximaci pro netransfekovanou buňku. Membránové proudy byly normalizovány na velikost amplitudy při 25 °C.

¹ Teplotní koeficient Q_{10} představuje míru změny biologického či chemického systému, která nastane jako důsledek změny teploty systému o 10 °C (K)

U TRPV3 receptoru není specifická aktivační fáze čistě exponenciální. V Arrheniovském vynesení lze někdy pozorovat dvě lineární fáze specifické aktivity charakterizované různými hodnotami teplotního koeficientu (Xu et al., 2002). Z tohoto důvodu jsme pro výpočet Q_{10} přirozených i mutantních TRPV3 receptorů použili jednodušší vzorec:

$$Q_{10} = \left(\frac{I_2}{I_1} \right)^{10/(T_2 - T_1)}$$

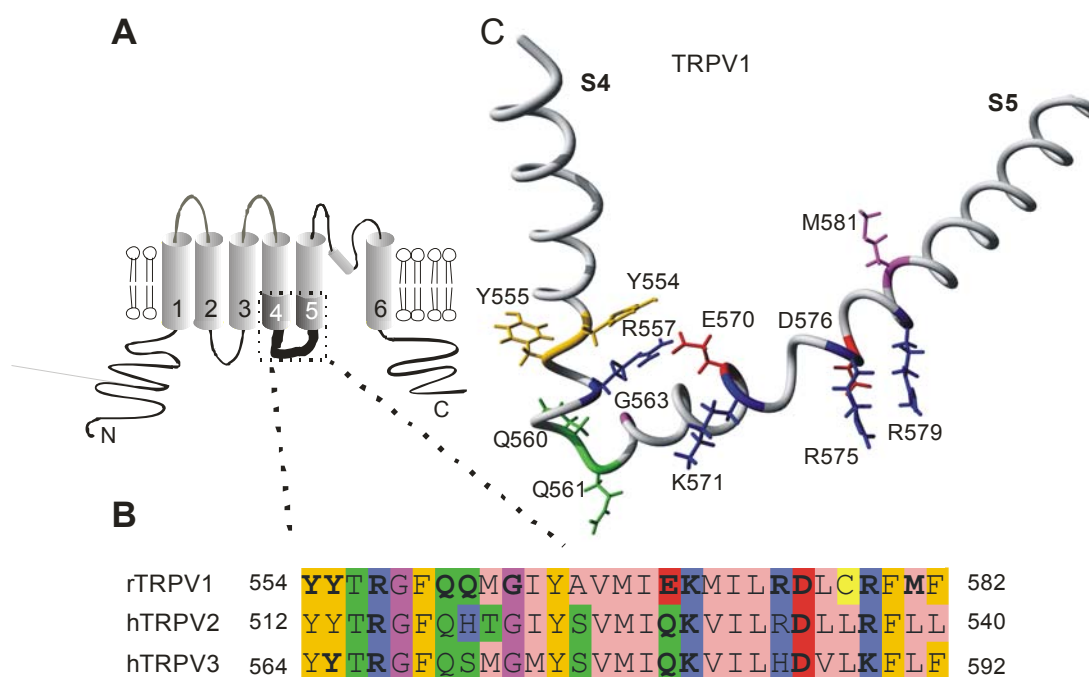
kde I_1 a I_2 jsou amplitudy proudových odpovědí při teplotách T_1 a T_2 . Hodnoty T_1 a T_2 byly voleny tak, aby přesahovaly aktivační práh TRPV3 receptoru.

Pro statistickou analýzu jsme používali program pCLAMP 9.2 a SigmaPlot 10 (Systat Software). Statistická významnost byla určena pomocí jednocestné analýzy variance (ANOVA). Pokud byl nalezen signifikantní rozdíl ($P < 0,05$ nebo $P < 0,001$), provedli jsme porovnání jednotlivých skupin za pomoci t -testu. Všechna data uvedená v této práci jsou vyjádřena ve formě průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka průměru.

6 Výsledky

6.1 S4-S5 oblast vaniloidních TRP iontových kanálů

Naším cílem bylo určit úlohu S4 segmentu a S4-S5 spojovací kličky ve funkci TRPV1 receptoru. Z porovnání sekvencí TRPV1, TRPV2 a TRPV3 iontových kanálů je zřejmé, že oblast S4-S5 kličky a přilehlá C-koncová část S4 transmembránového segmentu vykazují vysokou míru homologie (obrázek 6.1B), je tedy značně pravděpodobné, že daná oblast je rozhodující pro správnou funkci vaniloidních TRP receptorů. Homologní model příslušné oblasti TRPV1 receptoru je znázorněn na obrázku 6.1C.



Obrázek 6.1 S4/S4-S5 oblast TRPV receptorů. (A) Schematická struktura podjednotky vaniloidních TRP receptorů. (B) Porovnání sekvence S4/S4-S5 oblasti TRPV1 receptoru potkaního podtypu s odpovídajícími oblastmi lidského TRPV2 a TRPV3 iontového kanálu. **Thick letters** are amino acid residues selected for mutagenesis. (C) Model S4-S5 oblasti rTRPV1 vytvořený na podkladě známé krystalové struktury Kv1.2 iontového kanálu převzatý z (Brauchi et al., 2007).

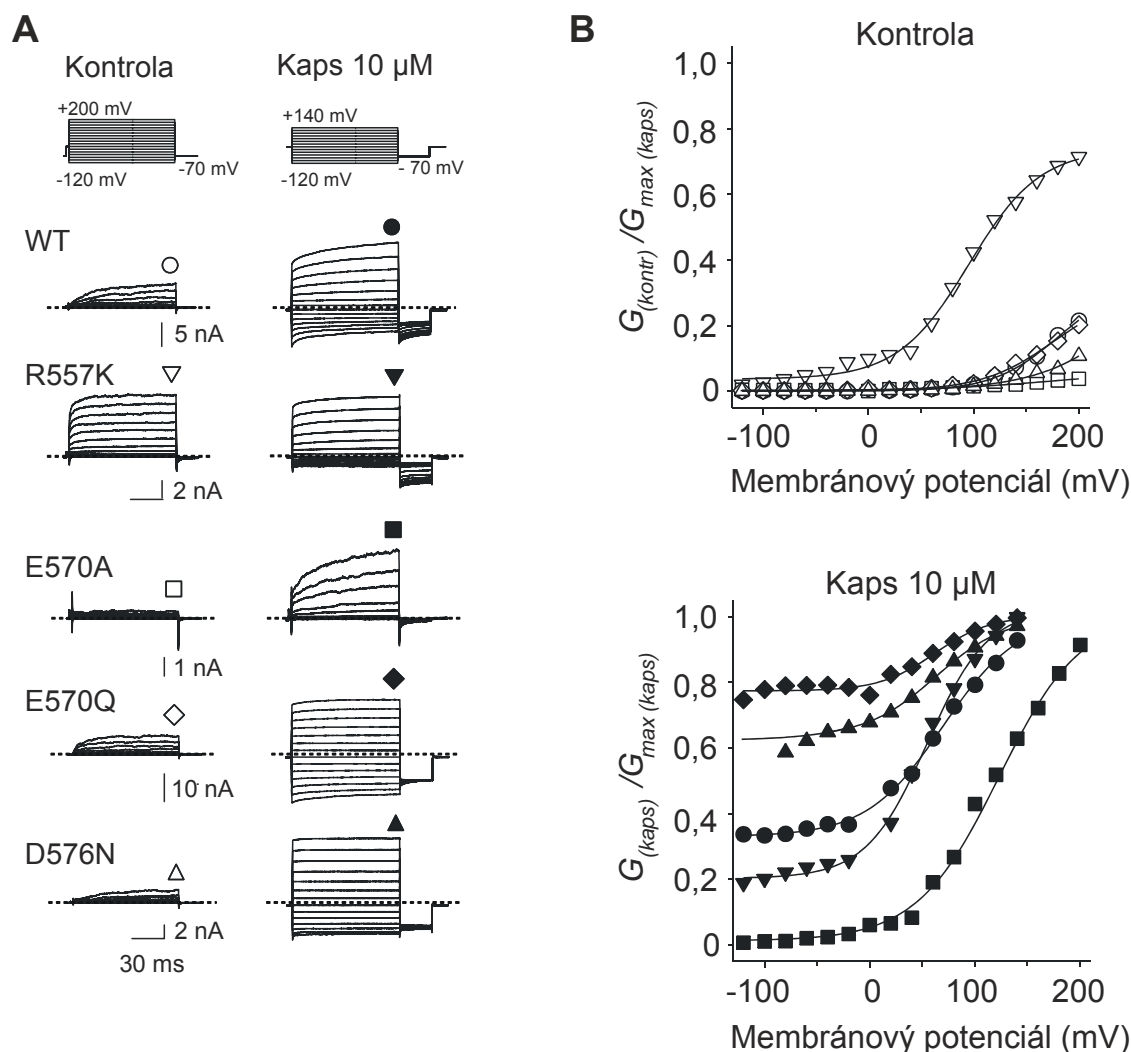
Vytvořili jsme mutantní formy potkaního podtypu TRPV1 receptoru s bodovými záměnami nabitých aminokyselinových zbytků v S4/S4-S5 oblasti (R557, E570, K571, R575, D576, R579). V kontrastu s tradičními napěťově ovládanými kanály se v S4 segmentu TRPV1 vyskytuje pouze jediné kladně nabitě reziduum, R557. Předpokládá se, že tento arginin je rozhodujícím aminokyselinovým zbytkem, který umožňuje

napětovou citlivost TRPV1 receptoru (Fernandez-Ballester a Ferrer-Montiel, 2008). Provedli jsme také mutace tyrosinových zbytků na pozicích Y554 a Y555, které by díky svým vnitřním dipólovým momentům mohly potenciálně přispívat k napětové citlivosti (Bezanilla, 2008). Nadto jsme připravili TRPV1 receptory s pozměněnými aminokyselinami na pozicích Q560, Q561 a M581, o kterých je známo, že ovlivňují míru aktivity TRPV1 receptoru (Myers et al., 2008). U TRPV3 se mutace glycinu na pozici G573 umístěné v S4-S5 spojovací klíče projevuje spontánní aktivitou receptoru (Xiao et al., 2008b). Zajímalo nás tedy, jestli k obdobnému poškození funkce dojde i při pozměnění homologické aminokyseliny u TRPV1 receptoru. Z homologických modelů TRPV1 vytvořených na podkladě známé krystalové struktury Kv1.2 iontového kanálu vyplývá, že rezidua R557 a E570 jsou ve vhodném vzájemném postavení, aby mezi nimi vznikla elektrostatická interakce (Brauchi et al., 2007; Fernandez-Ballester a Ferrer-Montiel, 2008) (obrázek 6.1C). Je možné, že elektrostatická interakce se uplatňuje i mezi opačně nabitými aminokyselinovými zbytky D576 a R579, které jsou od sebe odděleny právě dvěma rezidui, v proteinovém helixu jsou tedy pravděpodobně orientovány přibližně stejným směrem. Vytvořili jsme tři mutantní formy TRPV1 s dvojitými bodovými záměnami: R557E/E570R, D576R/R579D a D576R/R579E, abychom vyšetřením jejich funkčních vlastností vyzkoušeli platnost těchto hypotéz. Naším předpokladem bylo, že pokud je pro správnou funkci receptoru důležitá interakce R557-E570 nebo D576-R579, prepolarizováním jednotlivých aminokyselinových zbytků vzniknou iontové kanály s poškozenými funkčními vlastnostmi. Vytvořením zmíněných dvojmutantů, které by obnovily potřebné interakce, by pak mohlo dojít k navrácení či vylepšení funkčních vlastností konstruktů.

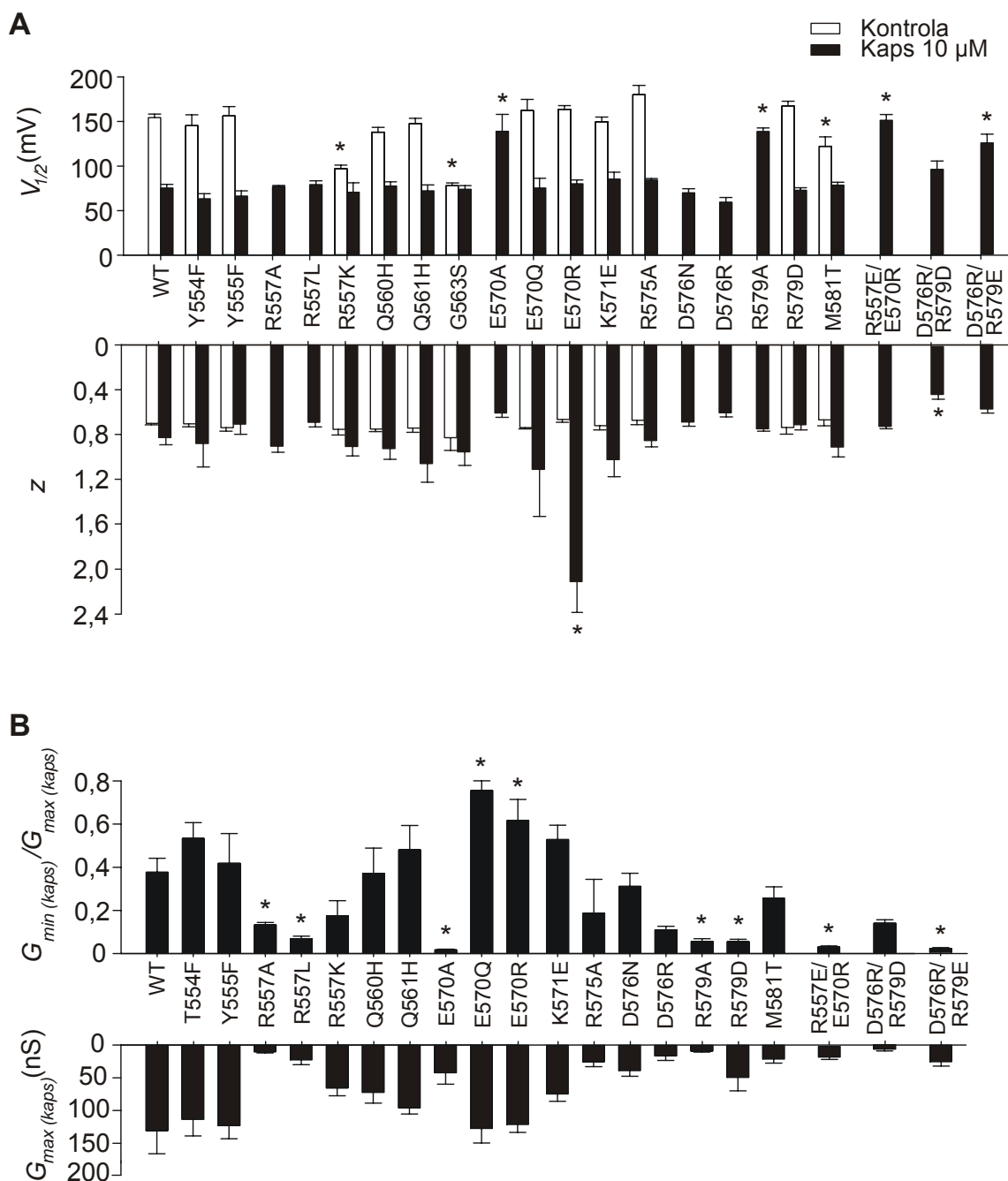
Mutace Y554A, Y555S, E570L a dvě mutace s výměnou kladného náboje za záporný, R557E a R579E, vedly ke vzniku nefunkčních kanálů. Tyto mutantní TRPV1 receptory neodpovídaly na chemické, teplotní a napětové podněty, ani je nebylo možné aktivovat kombinací zmíněných stimulů. Záměny Y554F a Y555F zachovaly všechny testované funkční vlastnosti iontového kanálu. Zdá se tedy, že na zmíněných pozicích je přítomnost aromatických reziduí nutná pro správnou funkci TRPV1 receptoru.

6.2 Napěťová citlivost mutantních forem TRPV1 receptoru

Nejprve jsme se pokusili charakterizovat napěťovou citlivost námi připravených pozměněných TRPV1 iontových kanálů. Buňky heterologně exprimující přirozené i mutantní formy TRPV1 receptoru jsme aktivovali pomocí sledu napěťových skoků nejprve v kontrolních podmínkách a následně v přítomnosti 10 μM koncentrace kapsaicinu. Reprezentativní záznamy jsou znázorněny na obrázku 6.2. Výsledky analýzy jsou shrnuty v obrázku 6.3.



Obrázek 6.2 Napěťová citlivost TRPV1 konstruktů. (A) Ukázky membránových proudů buněk exprimujících přirozené a mutantní formy TRPV1 receptoru vyvolaných sledem napěťových skoků (viz panel nad záznamy) nejprve v kontrolních podmínkách (bílé symboly) a následně v přítomnosti 10 μM koncentrace kapsaicinu (černé symboly). Nulová hladina membránového proudu je vyznačena přerušovanou čarou. Pro následnou analýzu byly použity amplitudy měřené na konci pulzu, kdy již bylo dosaženo rovnovážného stavu. (B) Vodivosti buněk získané ze záznamů zobrazených v panelu A normalizované vůči maximální dosažitelné vodivosti v přítomnosti 10 μM kapsaicinu ($G_{max(kaps)}$). Tuto hodnotu jsme získali výpočtem po proložení dat Boltzmanovou funkcí. Symboly pro jednotlivé konstrukty jsou převzaty z panelu A.



Obrázek 6.3 Zhodnocení napěťové závislosti TRPV1 konstruktů. (A) Průměrné hodnoty membránového potenciálu, při kterém dosahuje vodivost buňky poloviny svého maxima ($V_{1/2}$), zobrazené pro všechny funkční konstrukty a přirozenou formu TRPV1 receptoru (sloupce směřující vzhůru). Sloupce směřující dolů znázorňují průměrné hodnoty vrátkovacího náboje odvozeného výpočtem z předpisu Boltzmanovy funkce. Bílé sloupce reprezentují hodnoty získané v kontrolních podmínkách a černé sloupce popisují situaci, kdy byly buňky stimulovány napěťovými skoky v přítomnosti 10 μM kapsaicinu. Bílé sloupce chybí u konstruktů, jejichž $V_{1/2}$ přesahovalo +200 mV a tedy nebylo možné stanovit ani hodnotu vrátkovacího náboje. (B) Grafické zobrazení napěťově nezávislé složky odpovědi buněk na aplikaci 10 μM kapsaicinu (sloupce směřující vzhůru) a celkové zhodnocení maximální vodivosti buněk v přítomnosti 10 μM kapsaicinu pro jednotlivé konstrukty (sloupce směřující dolů). Hvězdička označuje signifikantní rozdíl v hodnotách veličin mutantních forem od „wild-type“ TRPV1 receptoru. U hodnot maximální vodivosti buněk jsme statistické rozdíly neurčovali, neboť tento parametr je vysoce variabilní a závisí na míře exprese jednotlivých konstruktů. Každý sloupec a příslušné chybové úsečky zobrazují průměrnou hodnotu a směrodatnou odchylku průměru.

V kontrolních podmínkách činila průměrná hodnota membránového potenciálu, při kterém dosahuje vodivost buňky poloviny svého maxima ($V_{1/2}$), u „wild-type“ TRPV1 154 ± 4 mV a hodnota vrátkovacího náboje (z) byla $0,70 \pm 0,01$ ($n = 59$) (obrázek 6.3A). U šesti konstruktů TRPV1 receptoru s jednoduchou bodovou záměnou (R557A, R557L, E570A, D576N, D576R, R579A) a u všech konstruktů s dvojitou bodovou záměnou (R557E/E570R, D576R/R579D, D576R/R579E) přesahovala hodnota $V_{1/2}$ parametry naší měřící aparatury (+200 mV). Dané záznamy nebylo možné spolehlivě proložit Boltzmanovou funkcí, a tedy jsme nemohli pro tyto konstrukty určit ani hodnotu vrátkovacího náboje. U tří mutantních forem jsme zaznamenali posun $V_{1/2}$ do oblasti menší depolarizace membránového potenciálu. $V_{1/2}$ činilo pro R557K 97 ± 4 mV ($n = 13$), pro G563S 78 ± 2 mV ($n = 6$) a M581T 122 ± 11 mV ($n = 11$). U všech konstruktů s $V_{1/2} < 200$ mV se hodnota vrátkovacího náboje statisticky nelišila od „wild-type“ formy TRPV1 ($P = 0,492$, obrázek 6.3A).

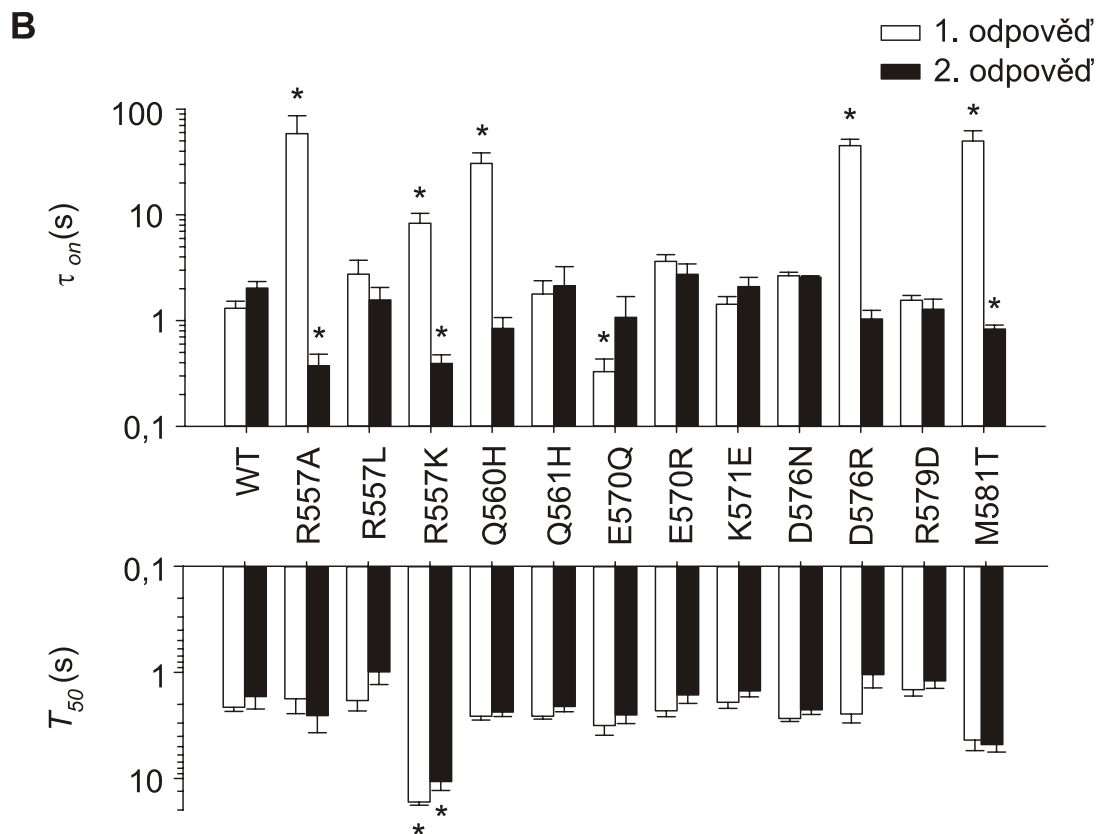
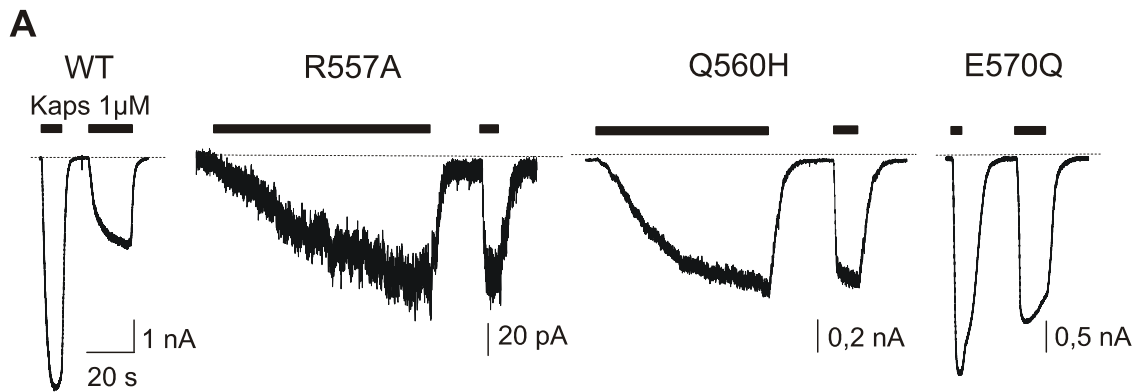
Depolarizace membránového potenciálu nedokáže maximálně aktivovat TRPV1 receptor. K plné aktivaci TRPV1 dochází až při synergistickém působení napětí s jiným aktivátorem, například kapsaicinem. Při současné stimulaci TRPV1 receptoru kapsaicinem a depolarizačním napětím je pravděpodobnost otevření kanálu vyšší, než může vyvolat saturující míra napěťového podnětu (Matta a Ahern, 2007). V přítomnosti 10 μ M kapsaicinu jsme v souladu se studií (Matta a Ahern, 2007) pozorovali zvýšení maximální hodnoty vodivosti buněk exprimujících přirozenou formu TRPV1 receptoru vyvolané depolarizací a posun $V_{1/2}$ k nižším hodnotám membránového potenciálu (75 ± 4 mV, $n = 18$) (obrázek 6.2B, 6.3A a 5.2). Průměrná hodnota vrátkovacího náboje z se v přítomnosti kapsaicinu mírně zvýšila na $0,83 \pm 0,06$, což znamená, že konformační změna vyvolaná vazbou kapsaicinu zvyšuje napěťovou citlivost TRPV1 receptoru.

V přítomnosti 10 μ M kapsaicinu se hodnota $V_{1/2}$ téměř všech funkčních konstruktů statisticky nelišila od „wild-type“ receptoru. Pouze u E570A, R579A, R557E/E570R a D576R/R579E dosahovalo $V_{1/2}$ vyšší hodnoty, než je charakteristické pro přirozenou formu TRPV1 receptoru ($V_{1/2}$ (E570A) = 139 ± 19 mV; $n = 5$, $V_{1/2}$ (R579A) = 139 ± 4 mV; $n = 9$, $V_{1/2}$ (R557E/E570R) = 151 ± 7 mV; $n = 6$, $V_{1/2}$ (D576R/R579E) = 125 ± 10 mV; $n = 9$). Vrátkovací náboj byl signifikantně menší pouze u D576R/R579D ($z = 0,43 \pm 0,4$; $n = 7$). U E570R mutantní formy jsme pozorovali signifikantně zvýšenou hodnotu vrátkovacího náboje oproti divokému typu receptoru ($z = 2,1 \pm 0,3$; $n = 6$).

Protokol, který jsme použili, dovoluje také stanovit napěťově nezávislou složku odpovědi na chemický podnět. TRPV1 receptor stimulovaný aplikací 10 μ M kapsaicinu zůstává částečně aktivovaný i za podmínek velmi negativního membránového potenciálu. Při popisu napěťové závislosti aktivace pomocí Boltzmanovy funkce není v tomto případě $G_{min (kaps)}$ blízké nule, na rozdíl od stimulace receptoru v kontrolních podmínkách (obrázek 5.2). Vztažením $G_{min (kaps)}$ k maximální dosažitelné vodivosti ($G_{max (kaps)}$) získáme procentuální vyjádření napěťově nezávislé komponenty aktivace vyvolané kapsaicinem. Ta činí u přirozené formy TRPV1 receptoru $38 \pm 7 \%$. U R557A, E570A, R579A, R579D, R557E/E570R a D576R/R579E byla napěťově nezávislá složka aktivace kapsaicinem signifikantně snížena ($P < 0,01$) (obrázek 6.3B). Zmíněné mutované formy mají zhoršenou citlivost ke kapsaicinu a/nebo zvýšené synergistické působení napěťových a chemických podnětů. Napěťově nezávislá komponenta kapsaicinové aktivace převažovala u mutančních forem E570Q ($76 \pm 5 \%$; $n = 3$) a E570R ($62 \pm 10 \%$; $n = 10$) (obrázek 6.3B).

6.3 Dynamické vlastnosti odpovědi na kapsaicin u mutančních forem TRPV1

U konstruktů, které umožňovaly zaznamenat proudové odpovědi buněk na aplikaci 1 μ M kapsaicinu při membránovém potenciálu -70 mV, jsme hodnotili i aktivační a deaktivací parametry odpovědi vyvolaných chemickou stimulací. Výsledky analýzy jsou zobrazeny na obrázku 6.4.

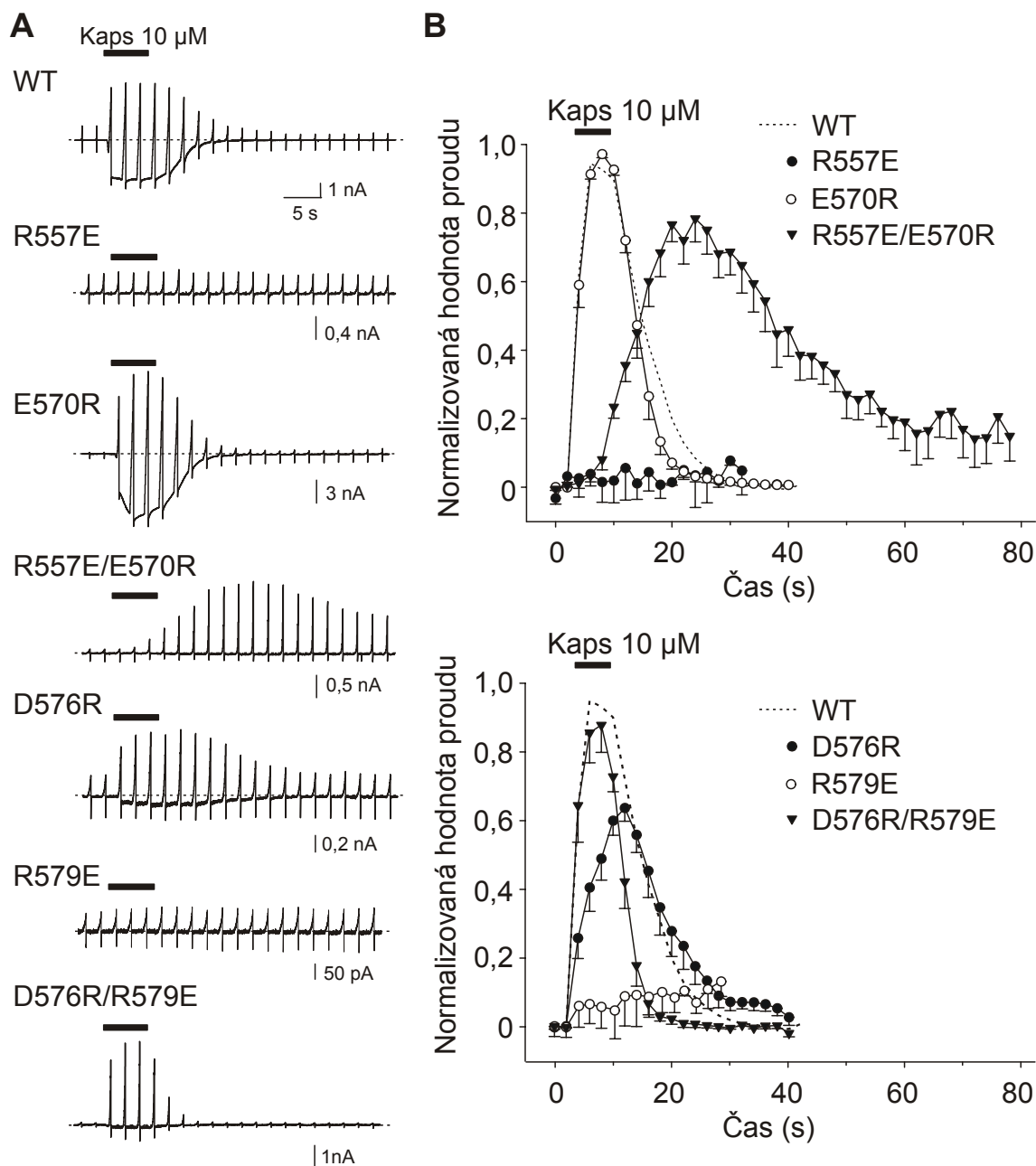


Obrázek 6.4 Rychlost aktivační a deaktivací fáze kapaicinových odpovědí. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí buněk na dvě následné aplikace 1 μ M kapaicinu měřených při membránovém potenciálu -70 mV. Záznamy jsou zobrazeny ve stejném časovém měřítku. (B) Porovnání časových konstant aktivace kapaicinových odpovědí (sloupce směřující nahoru) a rychlosti deaktivace (sloupce směřující dolů) pro vyznačené konstrukty.

Pro přirozenou formu TRPV1 receptoru činí časová konstanta aktivační fáze odpovědi (τ_{on}) při první aplikaci 1 μ M kapaicinu $1,3 \pm 0,2$ s ($n = 26$), pro následnou druhou odpověď je charakteristický mírně pomalejší nástup ($\tau_{on} = 2,0 \pm 0,3$ s; $n = 16$) a vlivem desenzitizace i menší amplituda odpovědi. Mutace E570Q urychlila nástup kapaicinové odpovědi u receptoru, který ještě nebyl vystaven chemické stimulaci ($\tau_{on} = 0,3 \pm 0,1$ s). Naopak mutace R557A, R557K, Q560H, D576R a M581T

prodloužily časovou konstantu aktivační fáze první kapsaicinové odpovědi (τ_{on} (R557A) = $58,7 \pm 27,7$ s; $n = 5$, τ_{on} (R557K) = $8,3 \pm 2,0$ s; $n = 10$, τ_{on} (Q560H) = $30,6 \pm 8,0$ s; $n = 6$, τ_{on} (D576R) = $45,1 \pm 6,9$ s; $n = 4$, τ_{on} (M581T) = $49,8 \pm 12,5$ s; $n = 8$). Rychlost nástupu odpovědi při druhé aplikaci 1 μ M kapsaicinu (následovala 20 s po prvním vystavení buňky působení agonisty, u R557K konstruktů musela tato doba být prodloužena na 120 s) byla u zmíněných konstruktů stejná jako pro „wild-type“ TRPV1, či dokonce rychlejší (u R557A, R557K, M581T) (obrázek 6.4). Rychlost deaktivace, kterou jsme určovali za pomoci hodnoty T_{50} (doba, za kterou klesne amplituda odpovědi při odmývání kapsaicinu na polovinu), byla v porovnání s přirozenou formou TRPV1 ($T_{50} = 2,2 \pm 0,2$ s; $n = 26$) signifikantně zpomalena pouze u R557K ($T_{50} = 16,7 \pm 1,2$; $n = 11$).

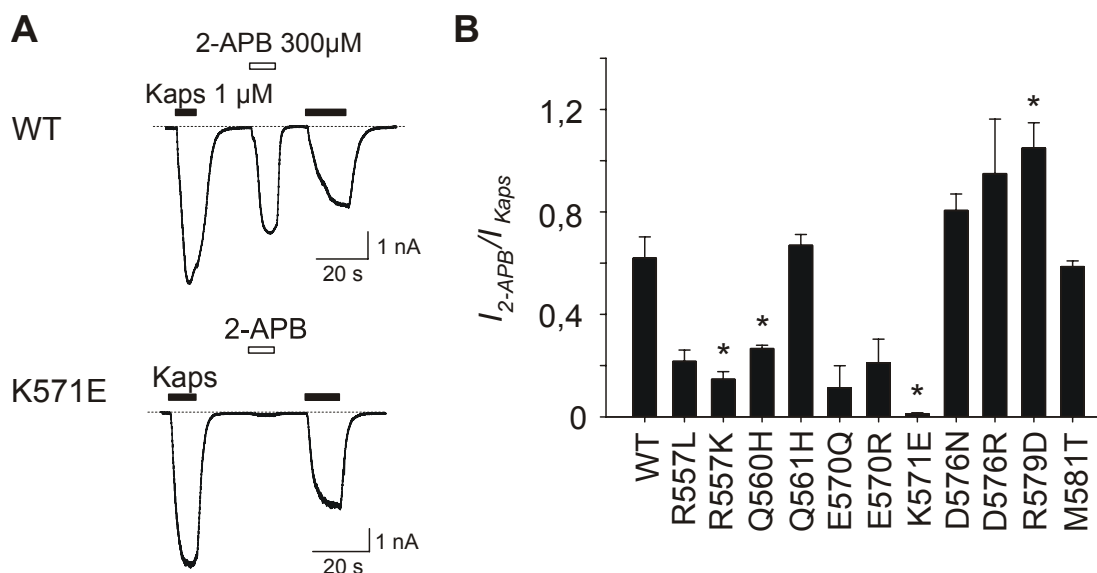
Abychom mohli analyzovat aktivační a deaktivální parametry kapsaicinových odpovědí konstruktů, u kterých nebylo možné měřit membránové proudy vyvolané aplikací agonisty při hodnotě membránového potenciálu -70 mV, použili jsme protokol sestávající z opakujících se lineárních zvýšení potenciálu z -70 mV na +100 mV. U všech funkčních konstruktů jsme po aplikaci kapsaicinu pozorovali zvýšení amplitudy membránového proudu měřeného na +90 mV. Pozměněnou dynamiku kapsaicinové potenciace napěťových podnětů jsme zaznamenali u TRPV1 receptoru s dvojitou bodovou záměnou R557E/E570R (obrázek 6.5), u kterého došlo ke zpomalení aktivační i deaktivální kinetiky. Maximální potenciační účinek kapsaicinu se u konstruktu R557E/E570R projevil po více jak deseti vteřinách po přepnutí do kontrolního roztoku.



Obrázek 6.5 Kapsaicin má potenciální účinek na odpovědi funkčních konstruktů při napět'ové stimulaci. (A) Reprezentativní záznamy odpovědi buněk exprimujících mutantní a „wild-type“ receptory při stimulaci napět'ovým protokolem, který sestával z lineárních zvýšení potenciálu z -70 mV na +100 mV v kontrolních podmínkách a při aplikaci 10 μM kapsaicinu. Membránové proudy konstruktů R557E a R579E vyvolané napět'ovou stimulací se neliší od odpovědi netransfekovaných buněk. Povšimněte si, že dvojitá záměna R557E/E570R a D576R/R579E obnovila funkční vlastnosti těchto konstruktů. (B) Časová závislost velikostí proudových odpovědí buněk měřených na +90 mV. Zobrazené hodnoty vznikly zprůměrněním 3-5 záznamů pro jednotlivé konstrukty (viz panel A) po odečtení klidové aktivity. Průměrné hodnoty pro „wild-type“ jsou vyznačeny přerušovanou čarou.

6.4 Citlivost mutantních TRPV1 receptorů na 2-APB

2-aminoetoxydifenylborát (2-APB) je společným aktivátorem TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptorů. Zajímalo nás, jak záměna aminokyselin v oblasti S4/S4-S5 ovlivní citlivost TRPV1 k 2-APB. U mutantních TRPV1 receptorů, které bylo možné aktivovat 1 μM kapsaicinem při membránovém potenciálu -70 mV, jsme určovali relativní velikost odpovědi vyvolané 300 μM 2-APB vztaženou k amplitudě kapsaicinové odpovědi (obrázek 6.6). Signifikantně menší odpovědi na 2-APB jsme pozorovali u R557K a Q560H konstruktů, ale především u K571E. Buňky exprimující pozměněnou formu TRPV1 receptoru s bodovou mutací na pozici 571 odpovídaly na aplikaci 300 μM 2-APB minimálním zvýšením membránového proudu ($I_{2-APB}/I_{kaps} = 0,012 \pm 0,004$; $n = 7$) na rozdíl od „wild-type“ iontového kanálu ($I_{2-APB}/I_{kaps} = 0,62 \pm 0,08$; $n = 18$).

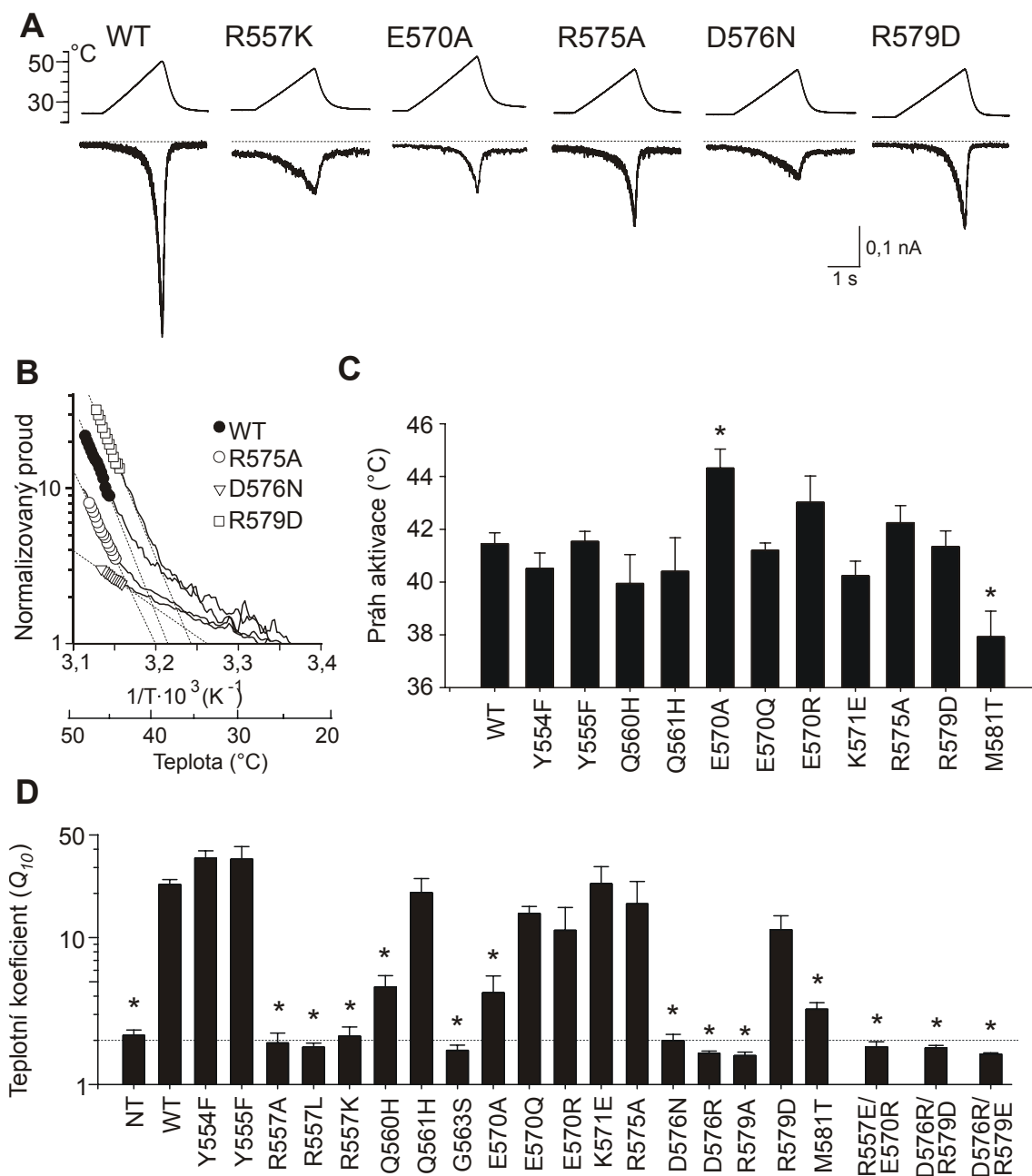


Obrázek 6.6 Citlivost mutantních TRPV1 receptorů na 2-APB. (A) Reprezentativní záznamy odpovědí buněk exprimujících „wild-type“ a K571E formy TRPV1 na chemickou stimulaci při membránovém potenciálu -70 mV. (B) Velikosti 2-APB odpovědi vybraných konstruktů vztažené k amplitudě odpovědi vyvolané 1 μM kapsaicinem.

6.5 Teplotní citlivost mutantních forem TRPV1

Citlivost na zvýšené teploty okolního prostředí je význačnou vlastností TRPV1 receptoru. Zajímalo nás tedy, jak mutace v oblasti S4/S4-S5 ovlivní charakteristické vlastnosti teplotní aktivace TRPV1 iontového kanálu – prahovou teplotu aktivace a teplotní koeficient (Q_{10}). Teplotní práh aktivace přirozené formy TRPV1 byl v našich

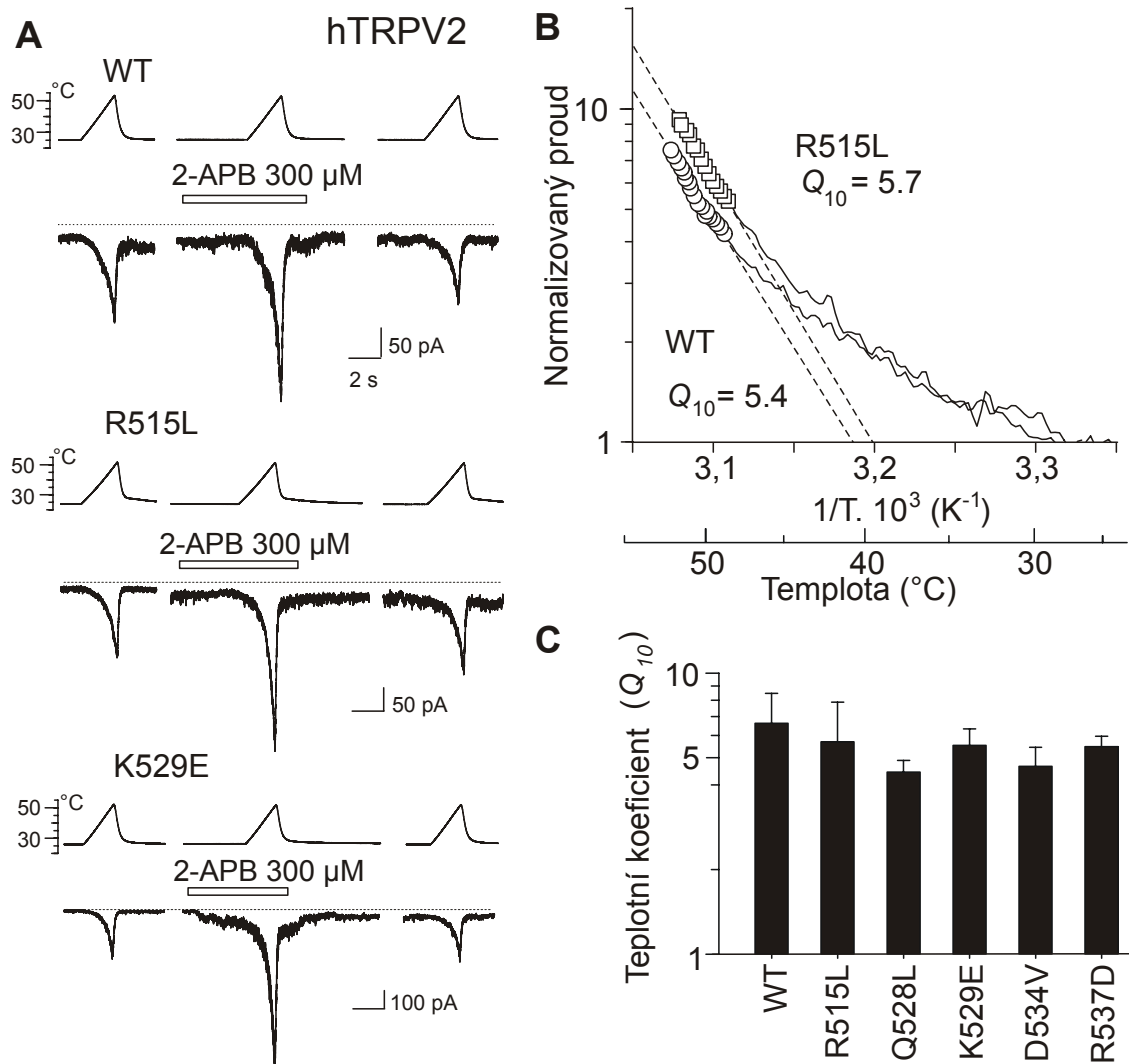
podmínkách $41,5 \pm 0,4$ °C a průměrná hodnota Q_{10} počítaného z teplotního rozmezí 43-48 °C činila $23,1 \pm 1,8$ ($n = 25$). U velké části receptorů s pozměněnou sekvencí v oblasti S4/S4-S5 došlo ke ztrátě teplotní citlivosti. Teplotní koeficient nerozlišitelný od kontrolních HEK293T buněk měly konstrukty R557A, R557L, R557K, G563S, D576N, D576R, R579A, R557E/E570R, D576R/R579D a D576R/R579E (obrázek 6.7). Mutantní iontové kanály Q560H, E570A a M581T vykazovaly signifikantně nižší Q_{10} než „wild-type“, přesto však tento parametr přesahoval hodnotu charakteristickou pro tepelně nespecifické děje ($Q_{10}(\text{Q560H}) = 4,6 \pm 0,9$; $n = 6$, $Q_{10}(\text{E570A}) = 4,2 \pm 1,3$; $n = 8$, $Q_{10}(\text{M581T}) = 3,3 \pm 0,3$; $n = 13$). Mezi konstrukty, které byly aktivovány tepelnými podněty, se aktivační práh změnil pouze u E570A (zvýšení teplotního prahu na $44,3 \pm 0,7$ °C; $n = 19$; $p < 0,001$) a M581T (snížení teplotního prahu na $37,9 \pm 1,0$ °C; $n = 13$; $p < 0,001$).



Obrázek 6.7 Teplotní citlivost mutantních TRPV1 receptorů. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí buněk exprimujících mutantní a „wild-type“ receptory při aktivaci tepelnými podněty (lineární zvýšení teploty experimentálního roztoku v rozmezí 25-48 °C), membránový potenciál -70 mV. (B) Arrheniovské vynesení proudových odpovědí buněk vyvolaných teplotní stimulací podle protokolu v A normalizované vůči amplitudě proudu na 25 °C. Teplotní koeficient Q_{10} byl stanoven pro každou buňku z oblasti dat, kde bylo Arrheniovské vynesení lineární (přerušované čáry). (C) Hodnoty teplotního aktivčního prahu pro konstrukty citlivé na stimulaci teplem. (D) Hodnoty teplotních koeficientů (Q_{10}) pro jednotlivé konstrukty, „wild-type“ a netransfekované buňky (NT). Tečkovaná čára značí hodnotu Q_{10} pro teplem vyvolané proudy, které jsou považovány za nespecifické.

6.6 Mutace homologických aminokyselin u TRPV2 a TRPV3 receptorů

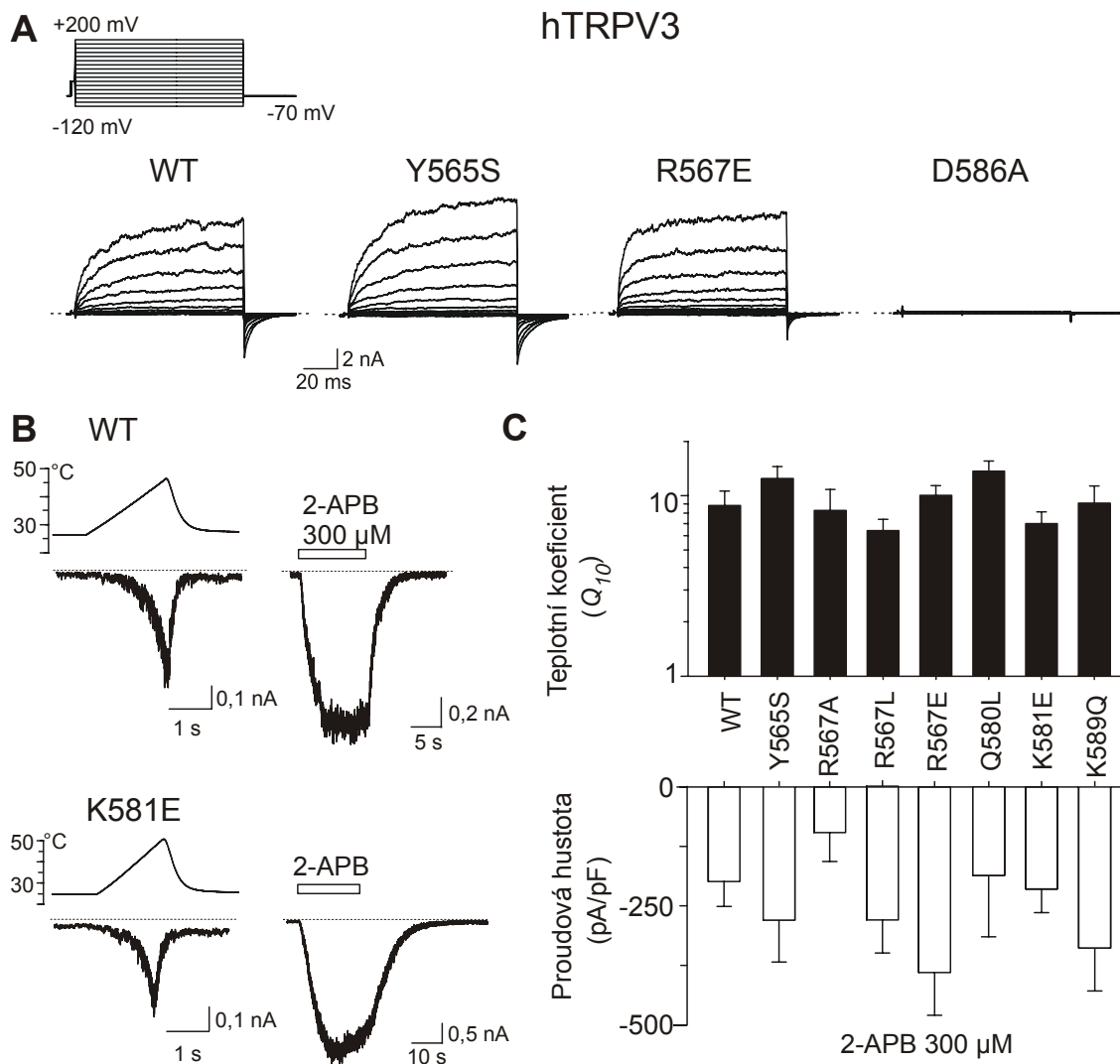
Oblast S4 transmembránového segmentu a S4-S5 spojovací kličky vykazuje vysokou míru homologie v rámci skupiny teplocitlivých TRPV receptorů (obrázek 6.1B). Zajímalo nás tedy, jestli mají jednotlivé aminokyselinové zbytky na homologických pozicích u TRPV2 a TRPV3 stejný význam pro funkční vlastnosti receptoru jako u TRPV1 iontového kanálu. Vytvořili jsme 5 typů pozměněných TRPV2 receptorů s bodovými mutacemi R515L, Q528L, K529E, D534V a R537D (srovnání s TRPV1 na obrázku 6.1B). Jako templát jsme použili lidský podtyp TRPV2 receptoru (hTRPV2), jehož teplotní citlivost byla dosud zpochybňována (Neeper et al., 2007). S využitím našeho aplikačního systému, který umožňuje přesnou regulaci teploty roztoku omývajícího měřenou buňku (viz metody), jsme byli schopni zaznamenat specifické teplem vyvolané odpovědi lidského podtypu TRPV2 receptoru (obrázek 6.8A,B). Práh aktivace jsme u hTRPV2 receptoru určili na $50,2 \pm 0,8$ °C a teplotní koeficient Q_{10} činil $6,6 \pm 1,8$ ($n = 10$). Teplem vyvolané proudové odpovědi byly potencovány v přítomnosti 300 μ M 2-APB (zvýšení na 260 ± 40 % při 54 °C; $n = 5$), tedy lidský TRPV2 receptor není plně necitlivý k 2-APB, jak se doposud předpokládalo (Neeper et al., 2007). Aktivita TRPV2 receptoru je jen velmi slabě modulována napěťovými podněty, z tohoto důvodu jsme charakteristiky napěťové stimulace nestudovali. hTRPV2 receptor s bodovou záměnou K529E se překvapivě vyznačoval stejnou citlivostí k 2-APB jako „wild-type“ (zvýšení membránového proudu při 54 °C na 260 ± 50 %; $n = 4$; $P = 0,951$) (obrázek 6.8A). Mutace lysinu na homologické pozici u TRPV1 receptoru vedla k výraznému snížení citlivosti k této látce (obrázek 6.6). U žádného z TRPV2 konstruktů jsme nezaznamenali odlišnou hodnotu teplotního koeficientu v porovnání s přirozenou formou receptoru ($P = 0,775$) (obrázek 6.8B,C).



Obrázek 6.8 Teplotní a chemická citlivost mutantních a „wild-type“ hTRPV2 receptorů. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí buněk exprimujících mutantní a přirozenou formu lidského TRPV2 receptoru. Buňky byly stimulovány lineárním zvýšením teploty experimentálního roztoku (25-57 °C; 10-14 °C/s) v kontrolních podmínkách a v přítomnosti 300 μM 2-APB při membránovém potenciálu -70 mV. (B) Arrheniovské vynesení záznamů z panelu A. Membránové proudy byly normalizovány vůči amplitudě při 25 °C. Hodnotu Q_{10} jsme odhadli z oblasti dat, kde bylo Arrheniovské vynesení lineární. (C) Hodnota teplotního koeficientu pro mutantní a „wild-type“ TRPV2 receptory ($n = 3-10$).

Pro lidský typ TRPV3 jsme vytvořili mutantní formy receptoru s bodovými záměnami aminokyselinových zbytků na pozicích Y565, R567, Q580, K581, D586 a K589 (obrázek 6.1B) a zkoumali jsme jejich vlastnosti vzhledem k napěťové, teplotní a chemické aktivaci (obrázek 6.9). $V_{1/2}$ bylo pro „wild-type“ TRPV3 receptor vyšší než +200 mV, tedy jsme jej v našich experimentálních podmínkách nemohli určit (obrázek 6.9A). Teplotní koeficient přirozené formy TRPV3 receptoru byl o málo vyšší než u TRPV2 receptoru ($Q_{10} = 8,8 \pm 1,8$; $n = 9$). Mutace D586A neodpovídala na teplotní, chemické ani napěťové podněty. Pouze při aplikaci 300 μM 2-APB a současné stimulaci tepelnými nebo napěťovými podněty, došlo k zvýšení aktivity tohoto

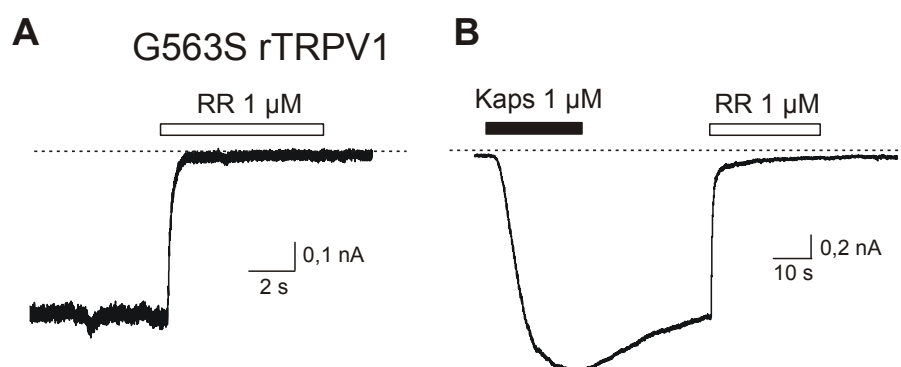
konstruktů. Ostatní námi připravené mutantní formy TRPV3 receptoru měly statisticky nerozlišitelné hodnoty teplotních koeficientů od „wild-type“ receptoru ($P = 0,344$) a jejich citlivost k 2-APB i napětí byla obdobná jako u přirozené formy iontového kanálu (obrázek 6.9).



Obrázek 6.9 Napěťová, teplotní a chemická citlivost mutantních a „wild-type“ forem TRPV3 receptoru. (A) Mutantní a „wild-type“ formy TRPV3 receptoru lidského podtypu jsme aktivovali pomocí série napěťových skoků od -120 mV do +200 mV po 20 mV (protokol je zobrazen nad záznamy). Hodnoty $V_{1/2}$ přesahovaly +200 mV, tedy jsme je nemohli přesně stanovit. Napěťová závislost z tohoto důvodu nemohla být aproximována Boltzmanovou funkcí. (B) Ukázky proudových odpovědí přirozené formy lidského TRPV3 receptoru a K581E mutantní formy při tepelné stimulaci (lineární zvýšení teploty 25-48 °C; 10-14 °C/s) a při aplikaci 300 μM 2-APB měřených na -70 mV. (C) Velikost teplotních koeficientů Q_{10} (černé sloupce) a velikosti proudových odpovědí vyvolaných aplikací 300 μM 2-APB (bílé sloupce) pro přirozenou formu TRPV3 a pro mutantní receptory ($n = 3-9$). Mutace D586A vedla ke vzniku nefunkčního kanálu, tedy zde nemohla být zhodnocena.

6.7 Funkční vlastnosti TRPV1 s bodovou záměnou G563S

Mutace glycinu (G573S nebo C), umístěného pravděpodobně na začátku S4-S5 spojovací kličky TRPV3 receptoru, vede ke vzniku spontánně aktivních receptorů, což je podkladem genetické poruchy bezsrstých kmenů hlodavců (Asakawa et al., 2006; Xiao et al., 2008b). Zajímalo nás, jak se homologické mutace projeví ve funkčních vlastnostech TRPV1 receptoru. Vytvořili jsme TRPV1 s bodovou záměnou G563S. Buňky exprimující zmíněnou formu receptoru vykazovaly pouze mírně zvýšenou bazální aktivitu. Klidový membránový proud tvořil $7,2 \pm 3,0$ % z proudu vyvolaného aplikací 1 μM kapsaicinu (měřeno při 25 °C a -70 mV membránového potenciálu; $n = 7$) (obrázek 6.10A). Jak již bylo uvedeno v kapitole 6.2, $V_{1/2}$ v kontrolních podmínkách bylo u G563S konstruktů posunuto do oblasti méně depolarizovaného membránového potenciálu ($77,6 \pm 2,4$ mV; $n = 6$) (obrázek 6.3A). Odpověď buňky vyvolaná 1 μM kapsaicinem se vyznačovala zpomalenou kinetikou nástupu ($\tau_{on} = 6,5 \pm 1,0$ s; $n = 6$) a neúplnou deaktivací. Aby došlo k snížení membránového proudu buňky na klidovou hodnotu po vystavení působení kapsaicinu, museli jsme aplikovat blokátor TRPV1 kanálu – rutheniovou červeň (obrázek 6.10B).



Obrázek 6.10 Poškozené deaktivční vlastnosti G563S mutantní formy TRPV1 receptoru. (A) U buněk s vyšší expresí G563S konstruktů bylo možné pozorovat zvýšený bazální membránový proud (při membránovém potenciálu -70 mV), který byl inhibován blokátorem TRPV1 iontového kanálu rutheniovou červeň. (B) Záznam odpovědi buňky exprimující TRPV1 receptor s bodovou mutací G563S při membránovém potenciálu -70 mV. Po přepnutí do kontrolního roztoku nedošlo k návratu membránového proudu na klidovou hodnotu, iontový kanál musel být inhibován 1 μM rutheniovou červeň.

7 Diskuze

7.1 Hledání napěťového senzoru TRPV1 receptoru

Mechanismus napěťové citlivosti je dobře popsán pro napěťově ovládané draslíkové a vápníkové kanály. Hlavní úlohu při otevírání těchto iontových kanálů v odpověď na změnu membránového potenciálu hrají zejména kladně nabitě aminokyselinové zbytky v S4 transmembránovém segmentu každé podjednotky. Mnohem méně je známo, jakým způsobem dokáží vnímat změny napětí TRP receptory. Je pravděpodobné, že napětí moduluje aktivační vlastnosti některých TRP receptorů, není však podnětem, který by dokázal sám o sobě zprostředkovat otevření těchto iontových kanálů. Prozatím byla publikována jediná práce zaměřená na lokalizaci napěťového senzoru u TRP receptorů (konkrétně TRPM8) (Voets et al., 2007). V S4 segmentu a ve spojovací kličce mezi S4 a S5 byly identifikovány dva kladně nabitě aminokyselinové zbytky, které určují napěťovou citlivost TRPM8 receptoru. Ze zmíněné studie dále vyplývá, že S4/S4-S5 oblast má obecnější úlohu v regulaci vrátkování TRPM8. Všechny konstrukty s mutovanými kladně nabitými aminokyselinovými zbytky v dané oblasti měly nejen pozměněnou napěťovou závislost, ale i jejich citlivost k chemickým a tepelným podnětům byla poškozena. Také skutečnost, že mutace některých aminokyselinových zbytků v S4/S4-S5 oblasti vaniloidních TRP receptorů vedou ke vzniku receptorů se zvýšenou aktivitou, poukazuje na úlohu této domény ve vrátkování TRP iontových kanálů (Myers et al., 2008; Rock et al., 2008; Xiao et al., 2008b; Krakow et al., 2009).

V naší studii jsme identifikovali dva nabitě aminokyselinové zbytky, R557 a D576, které by potenciálně mohly být součástí napěťového čidla TRPV1 receptoru. Tato rezidua by mohla reagovat na depolarizační změnu membránového potenciálu posunem směrem ven z buňky (v případě R557) či dovnitř buňky (D576) a vyvolat tak konformační změnu potřebnou pro otevření iontového kanálu. Při neutralizaci zmíněných aminokyselinových zbytků (R557A, R557L, D576N) či při záměně za opačně nabitý aminokyselinový zbytek (R557E, D576R) došlo k vážnému poškození napěťové závislosti TRPV1 receptoru (obrázek 6.3). R557E konstrukt se dokonce ukázal být nefunkčním (obrázek 6.5). $V_{1/2}$ pro dané konstrukty bylo posunuto do oblasti velmi silné depolarizace (> 200 mV), což nám znemožnilo aproximovat napěťovou závislost Boltzmannovou funkcí a tedy jsme nemohli stanovit ani hodnotu vrátkovacího

náboje. V podmínkách, kdy byl TRPV1 receptor aktivován vysokou koncentrací agonisty (10 μ M kapsaicin), se napěťová citlivost konstruktů nelišila od „wild-type“ receptoru. Dané výsledky lze vysvětlit dvěma způsoby. (i) U mutantních forem TRPV1 receptoru, které mají velmi poškozenou napěťovou závislost, může dojít k zvýšenému synergistickému působení depolarizace a kapsaicinu, a tím se parametry napěťové citlivosti v přítomnosti kapsaicinu blíží „wild-type“ receptoru. (ii) Aminokyselinové zbytky podmiňující napěťovou citlivost TRPV1 receptoru v konformaci s navázaným kapsaicinem se alespoň z části liší od těch, které určují napěťovou citlivost receptoru bez kapsaicinu. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že arginin na pozici 570 zvyšuje vrátkovací náboj formy receptoru s navázaným kapsaicinem, ale napěťovou citlivost v kontrolních podmínkách nemění (obrázek 6.3A).

R557 představuje jediný kladně nabitý aminokyselinový zbytek v S4 segmentu a tudíž mu byla přisuzována role napěťového čidla (Fernandez-Ballester a Ferrer-Montiel, 2008). Naše výsledky dokazují, že v podmínkách, kdy je receptor stimulován kapsaicinem, přítomnost kladně nabitého rezidua na pozici 557 není nutnou podmínkou napěťové citlivosti. R557 tedy jistě není jediným aminokyselinovým zbytkem, který tvoří napěťový senzor.

V S4 segmentu TRPV1 receptoru se nachází několik aminokyselinových zbytků obsahujících aromatické jádro, které by díky svému dipólovému momentu mohly přispívat k napěťové citlivosti iontového kanálu (Bezaniilla, 2008). Taková rezidua však mají velmi specifické vlastnosti a jejich náhrada za nearomatický aminokyselinový zbytek velmi často vede k závažnému poškození struktury receptoru, především pokud jsou lokalizovány v transmembránovém helixu. Mutace tyrosinových zbytků Y554 a Y555 za nearomatické aminokyseliny vedla ke vzniku nefunkčních TRPV1 receptorů, tedy jsme jejich napěťovou citlivost nemohli prověřit.

7.2 Úloha S4/S4-S5 oblasti ve vrátkování TRPV1 kanálu

Záměna argininu v S4 segmentu za jiné aminokyselinové zbytky vedla k pozměnění vrátkovacích vlastností TRPV1 kanálu nejen vzhledem k napěťové stimulaci, ale i při aktivaci chemickými a tepelnými podněty. Mutace za záporně nabitý glutamát vedla ke vzniku nefunkčního TRPV1 iontového kanálu. TRPV1 receptor, u něhož byl R557 zaměněn za jiné kladně nabitě reziduum – lysin, se vyznačoval ztrátou teplotní citlivosti, zvýšenou napěťovou závislostí a zpomalenou kinetikou první

odpovědi na aplikaci kapsaicinu (obrázek 6.2, 6.3, 6.4 a 6.7). Kladný náboj tedy není jedinou podmínkou pro správnou funkci TRPV1, je důležitá i patřičná velikost aminokyselinového zbytku na pozici 557. TRPV1 receptory s neutralizačními záměnami R557A a R557L nebylo možné aktivovat zvýšením teploty extracelulárního prostředí a jejich napěťová závislost v kontrolních podmínkách byla silně poškozena (obrázek 6.3 a 6.7). Kinetika kapsaicinových odpovědí byla u konstruktu R557L nerozlišitelná od „wild-type“ receptoru, R557A se vyznačoval zpomaleným nástupem první kapsaicinové odpovědi. Obdobně jako u R557K byla rychlost nástupu druhé odpovědi R557A konstruktů na kapsaicin mnohem vyšší než u první odpovědi, dokonce rychlejší než u nemutované formy TRPV1 (obrázek 6.4). Po vystavení působení kapsaicinu byly i odpovědi na napěťové podněty R557A a R557K konstruktů vyšší než před aplikací kapsaicinu.

Zmíněné funkční charakteristiky iontových kanálů se záměnami R557A a R557K si vysvětlujeme jako důsledek poškozeného deaktivčního mechanismu. Je možné, že mutace R557A a R557K vedou ke vzniku iontových kanálů, které se po aktivaci kapsaicinem nevrátí do původního obtížně aktivovatelného stavu, ale zůstanou v jiném stavu, který se vyznačuje odlišnou rychlostní konstantou pro přechod do aktivovaného stavu (otevření). Při druhé aplikaci kapsaicinu pak dochází u TRPV1-R557A a R557K k mnohem rychlejší odpovědi než při první stimulaci. Není jasné, jestli se do tohoto snadno aktivovatelného stavu mutantní TRPV1 receptory dostávají až po stimulaci kapsaicinem, nebo jestli je tento jev následkem samotného otevření iontového kanálu. Zvýšená napěťová závislost R557K konstruktů by v tomto případě mohla být vysvětlena tak, že část TRPV1 receptorů se ještě před vystavením působení kapsaicinu nacházela ve stavu neúplné deaktivace, která nastala po samovolném otevření iontového kanálu (bez přítomnosti aktivačního podnětu).

Obdobné charakteristiky odpovědí na kapsaicin jsme pozorovali u konstruktů Q560H, D576R a M581T (obrázek 6.4). TRPV1 receptor s bodovou záměnou M581T byl jinou výzkumnou skupinou označen za spontánně aktivní. Kvasinky, které exprimovaly iontové kanály se zmíněnou mutací, přežily pouze za podmínek, kdy živné médium obsahovalo inhibitor TRPV1 receptoru. V opačném případě způsobovala zvýšená intracelulární koncentrace vápenatých iontů smrt buněk (Myers et al., 2008). Je možné, že i v našich podmínkách docházelo k úhynu buněk s vysokou expresí TRPV1-M581T. Buňky, které exprimovaly na membráně menší množství proteinu

s bodovou záměnou M581T však byly životaschopné, tudíž mohly být použity k pokusu.

V našich podmínkách jsme spontánní aktivitu (zvýšený klidový membránový proud) pozorovali pouze u G563S konstruktů, jehož kapsaicinová odpověď se vyznačovala neúplnou deaktivací (obrázek 6.10). Je pravděpodobné, že mutace G563S vede ke stabilizaci otevřeného stavu kanálu. G563S konstrukt měl $V_{1/2}$ posunuté do méně depolarizovaných hodnot membránového potenciálu stejně jako R557K a M581T (obrázek 6.3A). Takto pozměněné $V_{1/2}$ může být považováno za znak kanálů ve snáze aktivovatelném stavu. Méně pozitivní $V_{1/2}$ je totiž příznačné pro receptory, které jsou stimulovány současně s depolarizačním napětím i jinými podněty (teplem, kapsaicinem) (Voets et al., 2004; Matta a Ahern, 2007). Naše data lze shrnout konstatováním, že relativně vzdálené bodové mutace v S4-S5 oblasti, R557K, G563S a M581T vedou ke vzniku iontových kanálů s podobným fenotypem.

V S4-S5 oblasti různých typů vaniloidních TRP receptorů bylo objeveno poměrně velké množství bodových záměn, které vedou ke zvýšené (či dokonce spontánní) aktivitě iontových kanálů (Asakawa et al., 2006; Myers et al., 2008; Rock et al., 2008; Xiao et al., 2008b; Krakow et al., 2009). Naše studie objasňuje, jaký mechanismus by mohl být podkladem zmíněného fenotypu mutantních TRPV1 kanálů. S4-S5 spojovací klíčka a přilehlé části transmembránových segmentů pravděpodobně určují deaktivální charakteristiky vrátkování TRPV1 iontového kanálu. Mutace v dané oblasti tak může vést k poškození deaktivace. Kanál, který není vystaven žádnému stimulačnímu podnětu, se s nízkou frekvencí otevírá. Pokud nedojde k rychlému zavření iontového kanálu, nebo první otevření způsobí vzrůst frekvence nebo trvání následujících otevření, bude klidový membránový proud buňky exprimující tento iontový kanál vyšší, než je obvyklé.

7.3 Interakce aminokyselinových zbytků v S4/S4-S5 oblasti TRPV1

Modely TRPV1 receptoru vytvořené na podkladě krystalové struktury Kv1.2 iontového kanálu umisťují arginin na pozici 557 do blízkosti aminokyselinového zbytku E570 (Brauchi et al., 2007; Fernandez-Ballester a Ferrer-Montiel, 2008). Model v práci (Fernandez-Ballester a Ferrer-Montiel, 2008) předpokládá vznik elektrostatických interakcí mezi těmito rezidui. Naše data potvrzují funkční souvislost mezi R557 a E570. Bodová záměna argininu za záporně nabitý glutamát vedla ke vzniku plně nefunkčního

kanálu (obrázek 6.5). Receptor s dvojitou záměnou R557E a E570R se však vyznačoval měřitelnými odpověďmi při současné stimulaci chemickými a napěťovými či teplenými podněty (obrázek 6.3 a 6.5). Mutace E570R tedy zčásti obnovila funkční vlastnosti R557E konstruktů. Modelovou situací, kdy je pro funkci receptoru zásadní přímá elektrostatická interakce R557 s E570, však vyvrací skutečnost, že E570R konstrukt je plně funkční. Naše výsledky lze vysvětlit pomocí hypotézy, že pro správnou činnost receptoru je nutná kation- π interakce mezi R557 a Y554 (hodnota energie vazby odhadnutá predikčním serverem <http://capture.caltech.edu> je větší než -3,16 kcal/mol) (Gallivan a Dougherty, 1999). Záměna R557 za opačně nabitý aminokyselinový zbytek či mutace Y554 za nearomatické reziduum vede k silnému poškození struktury TRPV1 receptoru, což je neslučitelné s funkčností iontového kanálu. V případě R557E/E570R konstruktů by mohla být zmíněná interakce částečně nahrazena jinou kation- π interakcí mezi Y554 a R570 (energie vazby -1,03 kcal/mol).

Obdobně TRPV1 receptor se zaměněným jiným kladně nabitým reziduem R579 za negativně nabitý glutamát nebylo možné aktivovat ani kombinací napěťových a chemických podnětů. Bodová mutace D576R částečně obnovila funkční vlastnosti R579E konstruktů (obrázek 6.3 a 6.5). Překvapivě mutace R579 za aspartát vedla ke vzniku receptoru s téměř shodnými aktivačními vlastnostmi jako má přirozená forma TRPV1 iontového kanálu, na rozdíl od konstruktů R579A, jehož vrátkování bylo postiženo (obrázek 6.3, 6.4B a 6.7). S přihlédnutím k funkčním charakteristikám D576N a D576R konstruktů lze říci, že pro správné vrátkování TRPV1 receptoru je důležité příhodné lokální rozložení náboje v okolí pozic 576 a 579. Konstrukt R575A byl nerozeznatelný od „wild-type“ receptoru, pravděpodobně tedy nezasahuje do této elektrostaticky významné oblasti receptoru.

Z našich dat vyplývá, že v některých případech má větší význam velikost či uspořádání aminokyselinového zbytku než vlastní náboj. Přepolarizování rezidua E570 či jeho náhrada za glutamin nevede k výraznému poškození funkce TRPV1 receptoru. E570A konstrukt má však silně poškozenou napěťovou, teplotní i chemickou citlivost, E570L konstrukt dokonce nevykazuje žádnou aktivitu při stimulaci. Obdobně náhrada kladně nabitého rezidua R579 za negativně nabitý glutamát či menší aspartát vede ke vzniku funkčně naprosto odlišných konstruktů (obrázek 6.3, 6.4 a 6.7).

7.4 K571 podmiňuje citlivost TRPV1 k 2-APB

2-aminoetoxydifenylborát (2-APB) je společným aktivátorem TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptorů. V naší práci jsme identifikovali aminokyselinový zbytek K571, který specificky podmiňuje citlivost TRPV1 receptoru k 2-APB. Vlastnosti K571E konstruktů vzhledem k napěťové, teplotní i kapsaicinové aktivaci se plně shodovaly s vlastnostmi přirozené formy receptoru, citlivost na 2-APB však byla výrazně snížena (více jak 50 krát) (obrázek 6.3, 6.4, 6.6 a 6.7). Tyto výsledky dále posilují hypotézu, že lze na teplocitlivé TRP receptory pohlížet jako na modulární proteiny, jejichž různé strukturální části jsou specificky přizpůsobeny k vnímání rozličných typů podnětů a tyto oblasti mohou být funkčně nezávislé.

Homologické mutace lysinu u TRPV2 a TRPV3 receptorů nevedla ke změně citlivosti na 2-APB (obrázek 6.8A a 6.9B,C). Tedy vazebné místo či způsob, jakým dochází k převedení vazby 2-APB na otevření kanálu, se u jednotlivých vaniloidních TRP iontových kanálů odlišuje. Tato domněnka je dále podpořena faktem, že u TRPV3 je znám aminokyselinový zbytek histidin umístěný na N-koncové intracelulární části receptoru, jehož mutace za asparagin specificky poškozuje citlivost na 2-APB. U TRPV1 a TRPV2 se však na zmíněné pozici vyskytuje právě asparagin (Hu et al., 2009).

7.5 Odlišná úloha konzervovaných aminokyselinových zbytků v S4/S4-S5 oblasti TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptorů

Pro zhodnocení funkčnosti TRPV2 a TRPV3 mutantních forem receptorů jsme porovnávali hodnoty jejich teplotních koeficientů s hodnotou získanou pro „wild-type“ receptory. Na TRPV1 iontovém kanálu jsme si ověřili, že teplotní citlivost je nejnáchylnějším znakem, který je postižen zásahy v S4/S4-S5 oblasti (obrázek 6.7D). Naše studie jako první stanovila teplotní koeficient a prahovou teplotu aktivace pro lidský podtyp TRPV2 receptoru (obrázek 6.8), který se doposud žádné výzkumné skupině nepodařilo stimulovat tepelnými podněty (na rozdíl od hlodavčích podtypů) (Neeper et al., 2007). Prahová teplota aktivace lidského TRPV2 receptoru je přibližně 50 °C, hodnota teplotního koeficientu je mnohem nižší než u TRPV1 receptoru (přibližně 7 vs. 23 pro TRPV1). Zjistili jsme také, že lidský TRPV2 si zachoval rudimentální citlivost k 2-APB. V našich podmínkách jsme nebyli schopni aktivovat

hTRPV2 aplikací 2-APB s maximální koncentrací 500 μM při pokojové teplotě (24-25°C) v souladu s publikacemi (Juvín et al., 2007; Neuper et al., 2007), pozorovali jsme však potenciační účinek 2-APB při teplotní stimulaci (> 54 °C).

Mutace lysinu umístěného ve spojovací klíčece mezi S4 a S5 segmentem není jedinou záměnou, která se projevila odlišně ve funkčních znacích TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptorů. Teplotní koeficienty pozměněných forem TRPV2 receptoru R515L, Q528L a D534V se signifikantně nelišily od hodnoty Q_{10} „wild-type“ iontového kanálu (obrázek 6.8B,C), analogické mutace u TRPV1 receptoru (R557L a D576N) však vedly k úplné ztrátě teplotní citlivosti (obrázek 6.7), či byly dokonce nefunkční (E570L). U TRPV3 receptoru tři bodové záměny (Y565S, R567E, Q580L), které u TRPV1 receptoru způsobily ztrátu všech funkčních vlastností (Y555S, R557E, E570L), neovlivnily napěťovou ani teplotní citlivost TRPV3 (obrázek 6.9). Odpovědi těchto konstruktů na aplikaci 2-APB také zůstaly nepozměněny. Konstrukt D586A-hTRPV3 se vyznačoval obdobnou ztrátou napěťové závislosti jako analogická mutace u TRPV1 receptoru (D576N) (obrázek 6.9A). Je možné, že dané reziduum je součástí napěťového senzoru obou podtypů vaniloidních TRP iontových kanálů. Jediný kladně nabitý aminokyselinový zbytek v S4 segmentu TRPV3 receptoru R567 (odpovídá argininu na pozici 557 u TRPV1 receptoru) však k napěťové citlivosti nepřispívá, jak dokazují záznamy aktivace konstruktu R567E napěťovými podněty (obrázek 6.9A).

Naše výsledky jsou překvapivé, vezmeme-li v úvahu vysokou míru homologie sekvencí S4/S4-S5 oblastí vaniloidních TRP receptorů. Zdá se, že specifické strukturní interakce, které podmiňují správné vrátkování TRPV1 receptoru, se neúčastní převodu informace o tepelných, napěťových a chemických podnětech v otevření TRPV2 a TRPV3 receptorů. O obdobné úloze S4-S5 spojovací klíčky ve vrátkování TRPV1 a TRPV3 však svědčí význam konzervovaného glycinu v dané oblasti. Mutace G563 (u TRPV1) a G573 (u TRPV3) za méně flexibilní aminokyselinový zbytek způsobuje analogický defekt (Xiao et al., 2008b) (obrázek 6.10). Je možné, že tento glycin zastává úlohu pohyblivého pantu v S4-S5 spojovací klíčece. Když je vyměněn za rigidnější reziduum, může docházet ke stabilizaci otevřeného stavu kanálu, což se projeví spontánní aktivitou u obou typů receptorů.

8 Závěr

- Identifikovali jsme dva nabitě aminokyselinové zbytky umístěné v S4/S4-S5 oblasti, které by případně mohly být součástí napěťového čidla TRPV1 receptoru – arginin na pozici 557 a aspartát na pozici 576. U TRPV3 receptoru mutace homologického argininu nevedla k pozměnění napětím vyvolané aktivity. Neutralizace aspartátu na pozici 586 poškodila napěťovou závislost TRPV3 receptoru, tedy není vyloučené, že dané reziduum přispívá k citlivosti na napěťové podněty i u TRPV3.
- Některé mutace v S4/S4-S5 oblasti (R557A, R557K, G563S a M581T) vedly k poškození deaktivace TRPV1 receptoru, což poukazuje na úlohu této oblasti v regulaci vrátkování. Změna deaktivčních vlastností, jako je například stabilizace otevřeného stavu, může být molekulárním vysvětlením fenotypu konstruktů s mutací v S4/S4-S5 oblasti, které se vyznačují zvýšenou (či dokonce spontánní) aktivitou.
- Prokázali jsme funkční interakci dvojic reziduí R557-E570 a D576-R579 u TRPV1 receptoru. Toto funkční spojení však pravděpodobně není dáno přímou elektrostatickou interakcí zmíněných párů aminokyselinových zbytků.
- Identifikovali jsme aminokyselinový zbytek K571, který specificky určuje citlivost TRPV1, ale ne TRPV2 a TRPV3 receptorů, k 2-APB.
- Mutace homologických reziduí v oblasti S4-S5 spojovací klíčky a v přilehlé části S4 segmentu se projevují různě u TRPV1, TRPV2 a TRPV3 iontových kanálů. I přes vysokou konzervovanost jsou patrně pro správnou funkci teplocitlivých iontových kanálů z rodiny TRPV potřebné odlišné struktury této oblasti.

9 Citovaná literatura

1. Andersson D.A., Gentry C., Moss S., Bevan S. (2008) Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28: 2485-2494.
2. 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: 2664-2672.
3. Bandell M., Story G.M., Hwang S.W., Viswanath V., Eid S.R., Petrus M.J., Earley T.J., Patapoutian A. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-857.
4. Bandell M., Dubin A.E., Petrus M.J., Orth A., Mathur J., Hwang S.W., Patapoutian A. (2006) High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* 9: 493-500.
5. Bautista D.M., Jordt S.E., Nikai T., Tsuruda P.R., Read A.J., Poblete J., Yamoah E.N., Basbaum A.I., Julius D. (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-1282.
6. Bautista D.M., Siemens J., Glazer J.M., Tsuruda P.R., Basbaum A.I., Stucky C.L., Jordt S.E., Julius D. (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448: 204-208.
7. Benedikt J., Samad A., Ettrich R., Teisinger J., Vlachova V. (2009) Essential role for the putative S6 inner pore region in the activation gating of the human TRPA1 channel. *Biochim Biophys Acta* 1793: 1279-1288.
8. Bezanilla F. (2008) How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 323-332.
9. Borjesson S.I., Elinder F. (2008) Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels. *Cell Biochem Biophys* 52: 149-174.
10. 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: 15494-15499.
11. 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: 4835-4840.

12. Brauchi S., Orta G., Mascayano C., Salazar M., Raddatz N., Urbina H., Rosenmann E., Gonzalez-Nilo F., Latorre R. (2007) Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10246-10251.
13. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
14. Caterina M.J., Rosen T.A., Tominaga M., Brake A.J., Julius D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441.
15. Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeitz K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313.
16. Colburn R.W., Lubin M.L., Stone D.J., Jr., Wang Y., Lawrence D., D'Andrea M.R., Brandt M.R., Liu Y., Flores C.M., Qin N. (2007) Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54: 379-386.
17. Cosens D.J., Manning A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224: 285-287.
18. Davis J.B., Gray J., Gunthorpe M.J., Hatcher J.P., Davey P.T., Overend P., Harries M.H., Latcham J., Clapham C., Atkinson K., Hughes S.A., Rance K., Grau E., Harper A.J., Pugh P.L., Rogers D.C., Bingham S., Randall A., Sheardown S.A. (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 183-187.
19. Dhaka A., Murray A.N., Mathur J., Earley T.J., Petrus M.J., Patapoutian A. (2007) TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54: 371-378.
20. Dittert I., Vlachova V., Knotkova H., Vitaskova Z., Vyklicky L., Kress M., Reeh P.W. (1998) A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods* 82: 195-201.
21. Dittert I., Benedikt J., Vyklicky L., Zimmermann K., Reeh P.W., Vlachova V. (2006) Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* 151: 178-185.
22. Elinder F., Nilsson J., Arhem P. (2007) On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiol Behav* 92: 1-7.
23. Erler I., Hirnet D., Wissenbach U., Flockerzi V., Niemeyer B.A. (2004) Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem* 279: 34456-34463.

24. Erler I., Al-Ansary D.M., Wissenbach U., Wagner T.F., Flockerzi V., Niemeyer B.A. (2006) Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J Biol Chem* 281: 38396-38404.
25. Fernandez-Ballester G., Ferrer-Montiel A. (2008) Molecular modeling of the full-length human TRPV1 channel in closed and desensitized states. *J Membr Biol* 223: 161-172.
26. Fujiwara Y., Minor D.L., Jr. (2008) X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J Mol Biol* 383: 854-870.
27. Gallivan J.P., Dougherty D.A. (1999) Cation-pi interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9459-9464.
28. Garcia-Sanz N., Fernandez-Carvajal A., Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., Fajardo-Sanchez E., Fernandez-Ballester G., Ferrer-Montiel A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24: 5307-5314.
29. Gaudet R. (2008) TRP channels entering the structural era. *J Physiol* 586: 3565-3575.
30. Gavva N.R., Klionsky L., Qu Y., Shi L., Tamir R., Edenson S., Zhang T.J., Viswanadhan V.N., Toth A., Pearce L.V., Vanderah T.W., Porreca F., Blumberg P.M., Lile J., Sun Y., Wild K., Louis J.C., Treanor J.J. (2004) Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 279: 20283-20295.
31. Gevaert T., Vriens J., Segal A., Everaerts W., Roskams T., Talavera K., Owsianik G., Liedtke W., Daelemans D., Dewachter I., Van Leuven F., Voets T., De Ridder D., Nilius B. (2007) Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest* 117: 3453-3462.
32. 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. *Nat Neurosci* 11: 1007-1013.
33. Guler A.D., Lee H., Iida T., Shimizu I., Tominaga M., Caterina M. (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22: 6408-6414.
34. Guo A., Vulchanova L., Wang J., Li X., Elde R. (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11: 946-958.
35. Hinman A., Chuang H.H., Bautista D.M., Julius D. (2006) TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19564-19568.

36. Hu H., Grandl J., Bandell M., Petrus M., Patapoutian A. (2009) Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1626-1631.
37. Hu H.Z., Gu Q., Wang C., Colton C.K., Tang J., Kinoshita-Kawada M., Lee L.Y., Wood J.D., Zhu M.X. (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279: 35741-35748.
38. Hwang S.W., Cho H., Kwak J., Lee S.Y., Kang C.J., Jung J., Cho S., Min K.H., Suh Y.G., Kim D., Oh U. (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6155-6160.
39. Chang Q., Gyftogianni E., van de Graaf S.F., Hoefs S., Weidema F.A., Bindels R.J., Hoenderop J.G. (2004) Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *J Biol Chem* 279: 54304-54311.
40. Christoph T., Gillen C., Mika J., Grunweller A., Schafer M.K., Schiene K., Frank R., Jostock R., Bahrenberg G., Weihe E., Erdmann V.A., Kurreck J. (2007) Antinociceptive effect of antisense oligonucleotides against the vanilloid receptor VR1/TRPV1. *Neurochem Int* 50: 281-290.
41. Chuang H.H., Prescott E.D., Kong H., Shields S., Jordt S.E., Basbaum A.I., Chao M.V., Julius D. (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-962.
42. Chuang H.H., Neuhausser W.M., Julius D. (2004) The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* 43: 859-869.
43. Chung M.K., Lee H., Caterina M.J. (2003) Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* 278: 32037-32046.
44. Chung M.K., Lee H., Mizuno A., Suzuki M., Caterina M.J. (2004a) 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24: 5177-5182.
45. Chung M.K., Lee H., Mizuno A., Suzuki M., Caterina M.J. (2004b) TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem* 279: 21569-21575.
46. Jin X., Touhey J., Gaudet R. (2006) Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J Biol Chem* 281: 25006-25010.
47. Jordt S.E., Tominaga M., Julius D. (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8134-8139.
48. Jordt S.E., Julius D. (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108: 421-430.

49. Jordt S.E., Bautista D.M., Chuang H.H., McKemy D.D., Zygmunt P.M., Hogestatt E.D., Meng I.D., Julius D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-265.
50. Jung J., Lee S.Y., Hwang S.W., Cho H., Shin J., Kang Y.S., Kim S., Oh U. (2002) Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 277: 44448-44454.
51. Juvin V., Penna A., Chemin J., Lin Y.L., Rassendren F.A. (2007) Pharmacological characterization and molecular determinants of the activation of transient receptor potential V2 channel orthologs by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Mol Pharmacol* 72: 1258-1268.
52. Karashima Y., Talavera K., Everaerts W., Janssens A., Kwan K.Y., Vennekens R., Nilius B., Voets T. (2009) TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1273-1278.
53. Kashiba H., Uchida Y., Takeda D., Nishigori A., Ueda Y., Kuribayashi K., Ohshima M. (2004) TRPV2-immunoreactive intrinsic neurons in the rat intestine. *Neurosci Lett* 366: 193-196.
54. Koizumi S., Fujishita K., Inoue K., Shigemoto-Mogami Y., Tsuda M., Inoue K. (2004) Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem J* 380: 329-338.
55. Koplas P.A., Rosenberg R.L., Oxford G.S. (1997) The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17: 3525-3537.
56. Krakow D., Vriens J., Camacho N., Luong P., Deixler H., Funari T.L., Bacino C.A., Irons M.B., Holm I.A., Sadler L., Okenfuss E.B., Janssens A., Voets T., Rimoin D.L., Lachman R.S., Nilius B., Cohn D.H. (2009) Mutations in the gene encoding the calcium-permeable ion channel TRPV4 produce spondylometaphyseal dysplasia, Kozlowski type and metatropic dysplasia. *Am J Hum Genet* 84: 307-315.
57. Kwan K.Y., Allchorne A.J., Vollrath M.A., Christensen A.P., Zhang D.S., Woolf C.J., Corey D.P. (2006) TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50: 277-289.
58. Latorre R., Brauchi S., Orta G., Zaelzer C., Vargas G. (2007) ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 42: 427-438.
59. Liedtke W., Choe Y., Marti-Renom M.A., Bell A.M., Denis C.S., Sali A., Hudspeth A.J., Friedman J.M., Heller S. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525-535.

60. Lishko P.V., Procko E., Jin X., Phelps C.B., Gaudet R. (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54: 905-918.
61. Liu B., Qin F. (2005) Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25: 1674-1681.
62. Liu D., Liman E.R. (2003) Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15160-15165.
63. Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309: 897-903.
64. Lu Z., Klem A.M., Ramu Y. (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413: 809-813.
65. Lundstrom K. (2004) Structural genomics on membrane proteins: mini review. *Comb Chem High Throughput Screen* 7: 431-439.
66. Macpherson L.J., Dubin A.E., Evans M.J., Marr F., Schultz P.G., Cravatt B.F., Patapoutian A. (2007) Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445: 541-545.
67. 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: 1093-1102.
68. Matta J.A., Ahern G.P. (2007) Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* 585: 469-482.
69. McCleverty C.J., Koesema E., Patapoutian A., Lesley S.A., Kreusch A. (2006) Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain. *Protein Sci* 15: 2201-2206.
70. McKemy D.D., Neuhauser W.M., Julius D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-58.
71. Mei Z.Z., Xia R., Beech D.J., Jiang L.H. (2006) Intracellular coiled-coil domain engaged in subunit interaction and assembly of melastatin-related transient receptor potential channel 2. *J Biol Chem* 281: 38748-38756.
72. Mezey E., Toth Z.E., Cortright D.N., Arzubi M.K., Krause J.E., Elde R., Guo A., Blumberg P.M., Szallasi A. (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3655-3660.

73. Mohapatra D.P., Wang S.Y., Wang G.K., Nau C. (2003) A tyrosine residue in TM6 of the Vanilloid Receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. *Mol Cell Neurosci* 23: 314-324.
74. Moiseenkova-Bell V.Y., Stanciu L.A., Serysheva, II, Tobe B.J., Wensel T.G. (2008) Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7451-7455.
75. Montell C., Jones K., Hafen E., Rubin G. (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230: 1040-1043.
76. Moqrich A., Hwang S.W., Earley T.J., Petrus M.J., Murray A.N., Spencer K.S., Andahazy M., Story G.M., Patapoutian A. (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307: 1468-1472.
77. Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., Garcia-Sanz N., Ferrer-Montiel A. (2004) Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* 279: 25665-25672.
78. Moriyama T., Higashi T., Togashi K., Iida T., Segi E., Sugimoto Y., Tominaga T., Narumiya S., Tominaga M. (2005) Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* 1: 3.
79. Mosavi L.K., Cammett T.J., Desrosiers D.C., Peng Z.Y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13: 1435-1448.
80. Myers B.R., Bohlen C.J., Julius D. (2008) A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron* 58: 362-373.
81. Nagata K., Duggan A., Kumar G., Garcia-Anoveros J. (2005) Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25: 4052-4061.
82. Neeper M.P., Liu Y., Hutchinson T.L., Wang Y., Flores C.M., Qin N. (2007) Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence. *J Biol Chem* 282: 15894-15902.
83. Nicholas R.S., Winter J., Wren P., Bergmann R., Woolf C.J. (1999) Peripheral inflammation increases the capsaicin sensitivity of dorsal root ganglion neurons in a nerve growth factor-dependent manner. *Neuroscience* 91: 1425-1433.
84. Nilius B., Talavera K., Owsianik G., Prenen J., Droogmans G., Voets T. (2005) Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567: 35-44.

85. Nilius B., Mahieu F., Prenen J., Janssens A., Owsianik G., Vennekens R., Voets T. (2006) The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Embo J* 25: 467-478.
86. Novakova-Tousova K., Vyklicky L., Susankova K., Benedikt J., Samad A., Teisinger J., Vlachova V. (2007) Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience* 149: 144-154.
87. Park U., Vastani N., Guan Y., Raja S.N., Koltzenburg M., Caterina M.J. (2008) Evaluation of TRPV2 function in mouse thermal nociception. In: *Nociceptors - New Biology, Official Satellite Meeting of the 12th World Congress on Pain*. Edinburgh.
88. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. (2002a) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-715.
89. Peier A.M., Reeve A.J., Andersson D.A., Moqrich A., Earley T.J., Hergarden A.C., Story G.M., Colley S., Hogenesch J.B., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. (2002b) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296: 2046-2049.
90. Perez C.A., Huang L., Rong M., Kozak J.A., Preuss A.K., Zhang H., Max M., Margolskee R.F. (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5: 1169-1176.
91. Phelps C.B., Huang R.J., Lishko P.V., Wang R.R., Gaudet R. (2008) Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry* 47: 2476-2484.
92. Phelps C.B., Wang R.R., Choo S.S., Gaudet R. (2010) Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J Biol Chem* 285: 731-740.
93. Premkumar L.S., Ahern G.P. (2000) Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408: 985-990.
94. Rock M.J., Prenen J., Funari V.A., Funari T.L., Merriman B., Nelson S.F., Lachman R.S., Wilcox W.R., Reyno S., Quadrelli R., Vaglio A., Owsianik G., Janssens A., Voets T., Ikegawa S., Nagai T., Rimoin D.L., Nilius B., Cohn D.H. (2008) Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat Genet* 40: 999-1003.
95. Rohacs T., Lopes C.M., Michailidis I., Logothetis D.E. (2005) PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8: 626-634.
96. Rosenbaum T., Gordon-Shaag A., Munari M., Gordon S.E. (2004) Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123: 53-62.

97. Salazar H., Jara-Oseguera A., Hernandez-Garcia E., Llorente I., Arias O., II, Soriano-Garcia M., Islas L.D., Rosenbaum T. (2009) Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nat Struct Mol Biol*.
98. Stein A.T., Ufret-Vincenty C.A., Hua L., Santana L.F., Gordon S.E. (2006) Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* 128: 509-522.
99. Stokes A.J., Shimoda L.M., Koblan-Huberson M., Adra C.N., Turner H. (2004) A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *J Exp Med* 200: 137-147.
100. Story G.M., Peier A.M., Reeve A.J., Eid S.R., Mosbacher J., Hricik T.R., Earley T.J., Hergarden A.C., Andersson D.A., Hwang S.W., 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: 819-829.
101. Strotmann R., Harteneck C., Nunnenmacher K., Schultz G., Plant T.D. (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2: 695-702.
102. Sugiura T., Tominaga M., Katsuya H., Mizumura K. (2002) Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88: 544-548.
103. Susankova K., Ettrich R., Vyklicky L., Teisinger J., Vlachova V. (2007) Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J Neurosci* 27: 7578-7585.
104. Suzuki M., Watanabe Y., Oyama Y., Mizuno A., Kusano E., Hirao A., Ookawara S. (2003) Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci Lett* 353: 189-192.
105. Szallasi A., Nilsson S., Farkas-Szallasi T., Blumberg P.M., Hokfelt T., Lundberg J.M. (1995) Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res* 703: 175-183.
106. Szallasi A., Blumberg P.M. (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51: 159-212.
107. Szallasi A., Cortright D.N., Blum C.A., Eid S.R. (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6: 357-372.
108. Takahashi N., Mizuno Y., Kozai D., Yamamoto S., Kiyonaka S., Shibata T., Uchida K., Mori Y. (2008) Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* 2: 287-298.

109. Talavera K., Yasumatsu K., Voets T., Droogmans G., Shigemura N., Ninomiya Y., Margolskee R.F., Nilius B. (2005) Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438: 1022-1025.
110. Taylor-Clark T.E., Udem B.J., Macglashan D.W., Jr., Ghatta S., Carr M.J., McAlexander M.A. (2008) Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol* 73: 274-281.
111. Todaka H., Taniguchi J., Satoh J., Mizuno A., Suzuki M. (2004) Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* 279: 35133-35138.
112. Togashi K., Hara Y., Tominaga T., Higashi T., Konishi Y., Mori Y., Tominaga M. (2006) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *Embo J* 25: 1804-1815.
113. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543.
114. Tsuruda P.R., Julius D., Minor D.L., Jr. (2006) Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* 51: 201-212.
115. Vaca L., Sinkins W.G., Hu Y., Kunze D.L., Schilling W.P. (1994) Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 267: C1501-1505.
116. Valente P., Garcia-Sanz N., Gomis A., Fernandez-Carvajal A., Fernandez-Ballester G., Viana F., Belmonte C., Ferrer-Montiel A. (2008) Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *Faseb J* 22: 3298-3309.
117. Vlachova V., Teisinger J., Susankova K., Lyfenko A., Etrich R., Vyklicky L. (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 23: 1340-1350.
118. Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flockerzi V., Nilius B. (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430: 748-754.
119. Voets T., Owsianik G., Janssens A., Talavera K., Nilius B. (2007) TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* 3: 174-182.
120. Vriens J., Watanabe H., Janssens A., Droogmans G., Voets T., Nilius B. (2004) Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 396-401.

121. Vriens J., Owsianik G., Janssens A., Voets T., Nilius B. (2007) Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 282: 12796-12803.
122. Wissenbach U., Boddling M., Freichel M., Flockerzi V. (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* 485: 127-134.
123. Wong G.Y., Gavva N.R. (2008) Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev*.
124. Wu L., Gao X., Brown R.C., Heller S., O'Neil R.G. (2007) Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1699-1713.
125. Xiao B., Dubin A.E., Bursulaya B., Viswanath V., Jegla T.J., Patapoutian A. (2008a) Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J Neurosci* 28: 9640-9651.
126. Xiao R., Tian J., Tang J., Zhu M.X. (2008b) The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active. *Cell Calcium* 43: 334-343.
127. Xu H., Ramsey I.S., Kotecha S.A., Moran M.M., Chong J.A., Lawson D., Ge P., Lilly J., Silos-Santiago I., Xie Y., DiStefano P.S., Curtis R., Clapham D.E. (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418: 181-186.
128. Xu H., Delling M., Jun J.C., Clapham D.E. (2006) Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 9: 628-635.
129. Yang F., Cui Y., Wang K., Zheng J. (2010) Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7083-7088.
130. Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K.L., Cook B., Wu D., Zuker C.S., Ryba N.J. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112: 293-301.
131. Zhang Z., Okawa H., Wang Y., Liman E.R. (2005) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate rescues TRPM4 channels from desensitization. *J Biol Chem* 280: 39185-39192.
132. Zurborg S., Yurgionas B., Jira J.A., Caspani O., Heppenstall P.A. (2007) Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci* 10: 277-279.