

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Martin Beneš**

**Signální transdukce v čichových senzorních neuronech  
obratlovců a nástroje pro její počítačovou simulaci**

Signal transduction in olfactory sensory neurons of vertebrates and tools for  
computer simulation

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Martin Zápotocký, PhD.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně citoval všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 8. 2012

Podpis

**Poděkování:**

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu své bakalářské práce Martinu Novotnému za ochotu, trpělivost a cenné rady, kterými mi při vypracování této práce pomohl.

## **Abstrakt**

Cílem této práce je shrnout poznatky o čichové transdukci obratlovců. Tato rešerše je rozdělena do čtyř částí, přičemž každá část je zaměřena na jiný aspekt čichové transdukce. Nejprve je proveden přehled základních elektrofyziologických metod používaných pro výzkum transdukce. Následuje podrobný popis celé transdukce na molekulární úrovni. Další část práce shrnuje, jaké jsou typy modelů a jak se dají využít při modelování čichové transdukce. V závěru této části je proveden podrobný popis dvou modelů. Jeden z nich popisuje počátek čichové transdukce od vazby odorantu na receptor po produkci cAMP a druhý se zabývá zpětnou negativní vazbou  $\text{Ca}^{2+}$ . Rešerše je zakončena přehledem softwarových nástrojů pro vytváření a analýzy modelů z předešlé části.

**Klíčová slova:** čichová transdukce, čichový sensorický neuron, modelování, simulační prostředí, biofyzikální modely

## **Abstract**

The purpose of this thesis is summing up the information about olfactory transduction of vertebrates. This review is divided into four parts, each part focuses on a different aspect of olfactory transduction. First there is an overview of basic electrophysiological methods used for transduction research, followed by a description of a complete transduction on a molecular level. Next is a summary of model types and their use in olfactory transduction simulation, including a detailed description of two models: One of them describes the beginning of olfactory transduction, from the odorant binding on the receptor to the cAMP production, the other deals with the negative feedback of  $\text{Ca}^{2+}$ . Finally there is an overview of software products designed to create and analyze the models from the preceding section.

**Key words:** olfactory transduction, olfactory sensory neuron, simulation, simulative environment, biophysical models

## Obsah

1.	Seznam obrázků .....	7
2.	Úvod .....	8
3.	Elektrofyzilogické metody .....	9
3.1.	Terčíkový zámek .....	9
3.2.	Napěťový zámek .....	10
3.3.	Fluorescenční měření $Ca^{2+}$ .....	11
4.	Signální transdukce v čichových sensorických neuronech .....	12
4.1.	Princip transdukce .....	12
4.2.	Odorant .....	13
4.3.	Odorant přenosné proteiny .....	13
4.4.	$G_{olf}$ .....	13
4.5.	Adenylát cykláza .....	13
4.6.	CNG kanály .....	14
4.7.	$Ca^{2+}$ dependentní – $Cl^-$ kanál .....	15
4.8.	Zpětná negativní vazba $Ca^{2+}$ .....	15
4.9.	Kalmodulin .....	16
4.10.	Kalmodulin kináza typu II .....	16
4.11.	Fosfodiesteráza .....	17
5.	Biofyzikální modely .....	18
5.1.	Pasivní a aktivní modely .....	18
5.2.	Síťové modely .....	19
5.3.	Biochemické modely .....	20
5.4.	Model oscilace vápníku díky zpětné negativní vazbě v čichových řasinkách .....	21

5.5.	Modelování a analýza citlivosti reakcí zahrnující receptory, G proteiny a efektory v čichových sensorických neuronech obratlovců.....	22
6.	Softwarové nástroje pro počítačovou simulaci .....	24
6.1.	Neuron .....	24
6.2.	Genesis.....	24
6.3.	Matlab .....	25
6.4.	Porovnání softwarových nástrojů .....	25
7.	Závěr .....	26
8.	Seznam literatury .....	27

## 1. Seznam obrázků

Obr. 1 – Možné konfigurace terčíkové zámku .....	10
Obr. 2 – Signální transdukce pro generování receptorového potenciálu .....	12
Obr. 3 – Zpětná negativní vazba $\text{Ca}^{2+}$ .....	16
Obr. 4 – Schéma pasivního a aktivního modelu .....	18
Obr. 5 – Schéma signální transdukce .....	21

## 2. Úvod

Čichové senzoričké neurony jsou bipolární neurony na počátku čichové dráhy. Nacházejí se ve specializované části nosní sliznice, která se nazývá čichová sliznice. Zajišťují vznik akčního potenciálu, který vzniká díky reakci neuronu na odorant. Dendrity těchto neuronů vybíhají do hlenové vrstvy nosní sliznice, zatímco axony se sdružují, procházejí skrz čichovou kost do přední jámy lebeční, kde vstupují do čichového bulbu. Odtud vedou axony mitrálních a chomáčekových buněk do primární čichové oblasti nacházející se v telencefalu. Dále může být informace vedena do amygdaly, enterinální kůry či talamu a dále do orbitofrontální korové oblasti.

Na molekulární úrovni spočívá vznik akčního potenciálu na reakci odorantů s receptory spřaženými G proteiny. Ty aktivují adenylátcyklázu, díky čemuž vzniká druhý posel cAMP, která způsobuje otevření  $\text{Na}^+$  iontových kanálů. Toto vede ke vtoku sodíku, který způsobuje depolarizaci řasinky, a následnému vzniku akčního potenciálu v čichovém neuronu.

Cílem této práce je shrnout molekulární mechanismy čichové transdukce u obratlovců. Tyto mechanismy jsou dobře charakterizované, avšak chybí kvantitativní popis celého systému. Budou zde shrnuty kvantitativní popisy samostatných celků, které již byly v nedávné minulosti provedeny. V první kapitole práce budou zmíněny také metody používané pro studium čichových neuronů. Dále bude velký důraz kladen na zpětnou negativní vazbu vápníku v čichové transdukci. Poslední část práce bude zaměřena na srovnání softwarových nástrojů pro simulaci čichové transdukce a vyhodnocení jejich vhodnosti.



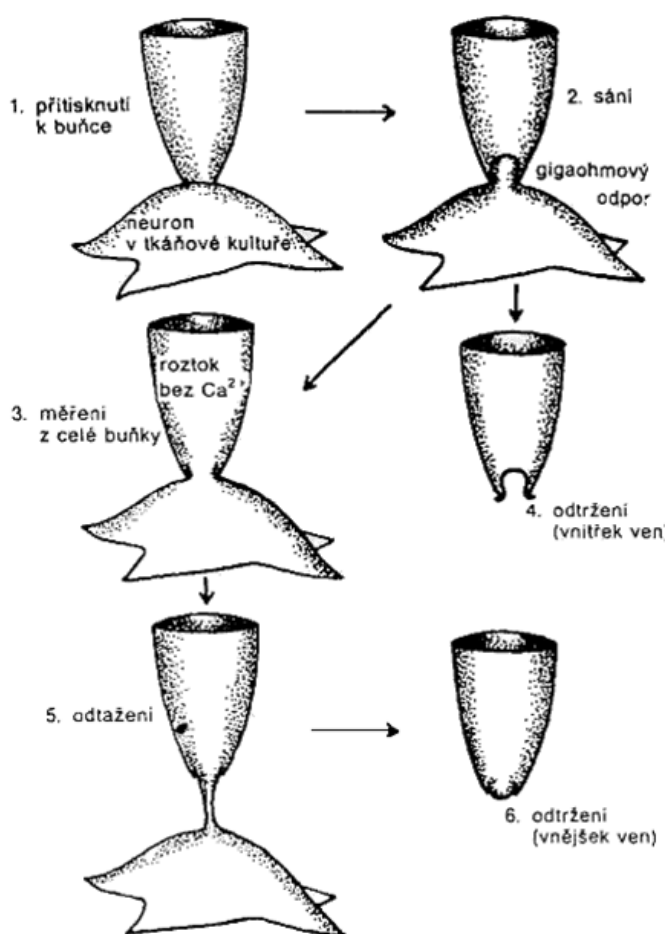
### 3. Elektrofyziologické metody

Mezi nejpoužívanější elektrofyziologické metody pro získávání dat z čichového senzoričkého neuronu patří napěťový zámeč, terčikový zámeč a fluorescenční značení  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 3.1. Terčikový zámeč

Terčikový zámeč neboli patch clamp je v dnešní době jedna z nejrozšířenějších elektrofyziologických metod. Byla vyvinuta mezi lety 1976 až 1981 Erwinem Neherem a Bertem Sackmanem, za což byli v roce 1991 oceněni Nobelovou cenou. Základním principem této metody je přisátí otavené skleněné mikroelektrody k membráně, kde díky vysoké přilnavosti lipidů k čistému sklu vznikne velmi pevné spojení, které vymezí terčik u ústí pipety v řádu jednotek mikrometrů. Terčik je tím elektricky izolován od okolí. Díky tomuto pak lze zkoumat aktivity jediné pumpy, iontového kanálu či zkoumat změny v kapacitě membrány a studovat proudy určitého typu v rámci celé buňky. Tato metoda se provádí v několika různých obecně určovaných konfiguracích podle toho, co chceme měřit.

Jednou z konfigurací, nazývanou vnitřek ven, používaných při studiu čichových neuronů je přisátí pipety k membráně a následné odtržení terčiku, přičemž vše je třeba provádět v roztoku bez  $\text{Ca}^{2+}$  a následně lze měřit proudy jednotlivých kanálů. Tato metoda byla využita při zkoumání CNG kanálů v čichové řasince (Zhainazarov 2004, Kurahashi 1992).



Obr. 1 – Možné konfigurace terčíkové zámku

### 3.2. Napěťový zámek

Napěťový zámek je elektrofyziologická metoda vynalezená roku 1949 Colem a Curtisem. V roce 1952 byla zdokonalena Hodgkinem, Huxlezem a Katzem. Princip této metody spočívá v tom, že do buňky jsou zavedeny 2 mikroelektrody, z nichž jedna udržuje membránový potenciál na námi zvolené výši pomocí elektrických pulzů a druhá zaznamenává toky proudů oproti elektrodě, která je umístěná vně buňky. V současné době jsou však i elektrody, které dělají obě funkce současně. Tato metoda napěťového zámku umožňuje měřit velikosti proudů potřebných k dosažení určitého membránového potenciálu. K tomuto uspořádání můžeme také přidat specifické blokátory jednotlivých iontových kanálů a tak určit například typ proudu zodpovědného za danou odpověď,

což umožňuje analyzovat jednotlivé fáze akčního potenciálu, co se týká směru toku a typu iontů.

Tato technika byla využita například při určování napětí a proudů způsobených  $\text{Ca}^{2+}$  na zebrafish (Corotto 1996).

### **3.3. Fluorescenční měření $\text{Ca}^{2+}$**

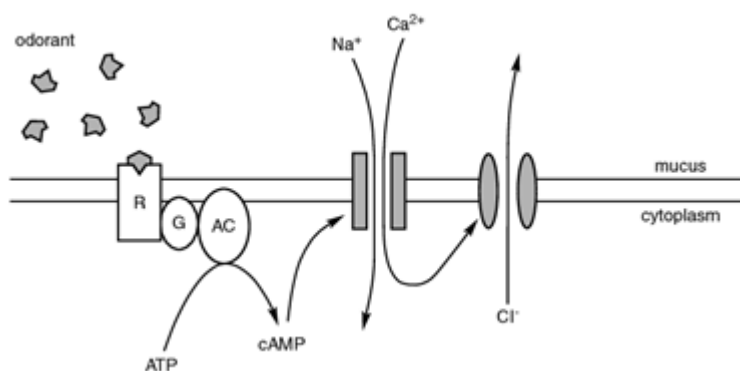
Pro měření koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  se používá technika, která byla původně vyvinuta pro zaznamenávání  $\text{Ca}^{2+}$  z jednotlivých sarkomer v kosterním svalu. Uspořádání se až zase tolik neliší od klasického uspořádání při fluorescenční mikroskopii. Používá se argon-iontový laser a invertovaný mikroskop. Excitační záření je vyvoláno  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescenčním indikátorem fluo-3 AM. Na rozdíl od klasického fluorescenčního uspořádání je tělo neuronu vtaženo do špičky pipety, což zachovává buňku v pevné poloze vzhledem k laseru a také umožňuje měřit receptorový proud (Reisert 2001, Leinders-Zufall 1998).

## 4. Signální transdukcce v čichových sensorických neuronech

### 4.1. Princip transdukcce

U většiny obratlovců je generování receptorového potenciálu díky přítomnosti odorantu stejné. Hlavní prvky této dráhy se nacházejí v čichové řasince. Prvním krokem transdukcční dráhy je vazba odorantu, nacházejícího se v hleny kolem řasinky, na receptor. Následně receptor aktivuje G protein, který svou aktivitou aktivuje adenylát cyklázy typu III, což způsobí nárůst koncentrace cAMP uvnitř řasinky. Dostatečná koncentrace cAMP poté otevírá první z 2 transdukcčních kanálů, a to CNG kanály. Tyto kanály činí řasinku vysoce propustnou pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky má za následek depolarizaci buňky, což má za následek první část akčního potenciálu. Jakmile je koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  uvnitř buňky dostatečně vysoká, otvírají se druhé transdukcční kanály, a to  $\text{Ca}^{2+}$  řízené  $\text{Cl}^-$  kanály. Otevření těchto kanálů učiní buňku vysoce propustnou pro  $\text{Cl}^-$  a způsobí další depolarizaci, což je druhá část akčního potenciálu.

Uvedené děje jsou probrány detailněji níže.



**Obr. 2** – Signální transdukcce pro generování receptorového potenciálu

Rovnoběžné vodorovné čáry reprezentují vnitřní a vnější povrch cytoplazmatické membrány řasinky čichového sensorického neuronu, R zastupuje receptorový protein vázající odorant, G označuje GTP-vázající protein, AC je adenylát cykláza typu III, šedé obdélníky jsou CNG kanál a šedé ovály jsou  $\text{Ca}^{2+}$  řízený  $\text{Cl}^-$  kanál. Obrázek převzat z Kleene 2008.

## 4.2. Odorant

Existuje velké množství receptorových proteinů vázajících odorant - u člověka je to 347 (Mysliveček 2009) - přičemž jejich exprese je u jednotlivců různá. Používají se 2 metody s cílem zvýšit pravděpodobnost reakce. První je vyšší koncentrace odorantu, běžně až 10 mM. Druhou možností je použití směsi častých odorantů s tím, že jeden zareaguje. S úspěchem se používá směs cineolu, n-amyl acetátu a isoamyl acetátu. V izolovaných neuronech bývá nižší úspěšnost reakce, 2-30%, než u neuronů zanechaných v epitelu nosní sliznice, kde se úspěšnost pohybuje mezi 30 – 80%.

## 4.3. Odorant přenosné proteiny

Existence odorant přenosných proteinů (OBP) byla předpovězena na základě skutečnosti, že hydrofobní odorant musí cestovat po inhalaci cestou k receptorům na čichových řasinkách přes vodnatý hlen. OBP je homodimer ze dvou 19 kDa podjednotek s afinitou k odorantům. OBP jsou lokalizovány v hlenu tak, aby mohly zachytit odorant a posunout ho po inhalaci k receptorům, případně ho od receptorů zase odstranit.

## 4.4. $G_{olf}$

$G_{olf}$  je heterotrimer složený z podjednotek ( $\alpha\beta\gamma$ ).  $G_{olf}$  se nachází pouze v čichovém epitelu. Je kódován mRNA, která je exprimována pouze v čichovém neuroepitelu. Podjednotka  $G_{olf\alpha}$  se funkčně i strukturně podobá  $G_{sa}$ . Mají shodnou funkci, tou je stimulace adenylát cyklázy, a také 88% aminokyselin mají identických (Jones 1989).

## 4.5. Adenylát cykláza

Adenylát cykláza je jedním z enzymů v čichových sensorických neuronech a je významná hlavně díky tvorbě detekovatelného cAMP a množství adenylát cyklázy v čichových sensorických neuronech. Především se jedná o adenylát cyklázu typu III, která je charakteristická pro čichové sensorické neurony a je aktivována G proteiny.

V řasinkách se nacházejí i další typy adenylát cykláz (např. typu II a IV), které by se mohly čichové transdukce také účastnit, avšak patrně nebudou při transdukci tak důležité jako adenylát cykláza typu III, protože myši s nefunkční adenylát cyklázou typu III nevykazují žádnou odpověď na odoranty a krom toho vykazují i známky změn v chování (Wong 2000).

#### 4.6. CNG kanály

CNG kanály jsou tetramery. V čichových sensorických neuronech se skládají ze dvou podjednotek CNGA2, jedné podjednotky CNGA4 a jedné podjednotky CNGB1b (Zheng 2004). Tyto kanály se nacházejí ve všech částech čichového sensorického neuronu, avšak v řasinkách se nacházejí s mnohem větší hustotou. Odhadovaná hustota kanálů v řasinkách se liší jednak druh od druhu, např. 1750 kanálů/ $\mu\text{m}^2$  u ropuchy (Kurahashi 1993) či 8 kanálů/ $\mu\text{m}^2$  u potkana (Reisert 2003), jednak i v závislosti na použité metodě. Dlouho převažoval názor, že k otevření CNG kanálu je potřeba vazby dvou molekul cAMP, avšak v nedávné minulosti se ukázalo, že vazba druhé molekuly cAMP pouze zvyšuje pravděpodobnost, že se kanál otevře, na hodnoty okolo 70 až 80% (Biskup 2007). Žádný specifický blokátor CNG kanálu není znám, ale fosfatidylinositol trifosfát výrazně snižuje citlivost k cAMP (Zhainazarov 2004).

Otevřený kanál se stává propustným jak pro jednomocné ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ , přičemž pro sodík je propustnost zhruba o 20% větší, tak i pro dvojmocné ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Procházející dvojmocné ionty se v kanálu dočasně váží a vytvářejí otevřený kanálový blok, což snižuje velikost akčního potenciálu. CNG kanály přispívají k receptorovému potenciálu mimo jiné i vtékajícími  $\text{Ca}^{2+}$ , avšak jejich příspěvek k receptorovému potenciálu je podstatně větší, pokud je extracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  odstraněn. I přes tento fakt s rostoucí koncentrací extracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  roste i podíl na receptorovém potenciálu vzniklý transportem  $\text{Ca}^{2+}$ . Při extracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM a depolarizaci na -70 mV činí tento podíl 40% (Dzeja 1999). Bloky vzniklé dočasným vázáním  $\text{Mg}^{2+}$  iontů můžeme v transdukci zanedbat, jelikož jsou účinné jen v kladných potenciálech. Intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  nehrají roli při vytváření otevřených kanálových bloků, avšak

ovlivňují CNG kanály pomocí negativní zpětné vazby kalmodulinu, což bude popsáno dále.

#### 4.7. $\text{Ca}^{2+}$ dependentní – $\text{Cl}^-$ kanál

Odhadovaná hustota kanálů je na rozdíl od CNG kanálů druhově shodná a pohybuje se okolo 62 kanálů/ $\mu\text{m}^2$  (Reisert 2003).

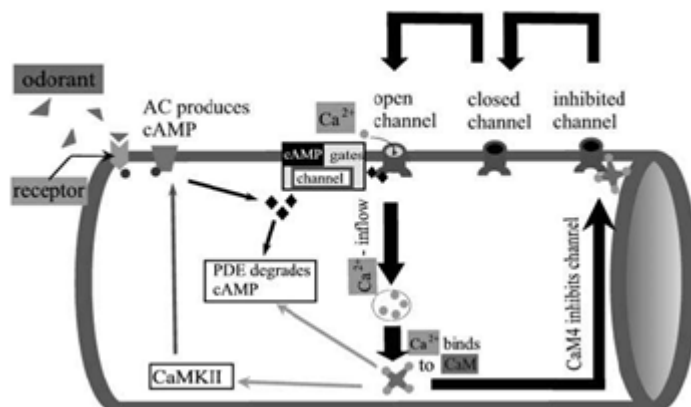
Poměr maximálních proudů CNG a  $\text{Cl}^-$  kanálů odráží hlavně jejich četnost. Toto je důvod, proč se u žáby maximální proudy prakticky rovnají, zatímco u potkana je maximální proud  $\text{Cl}^-$  kanálů větší až o třetinu (Reisert 2003).

Mezi intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  a proudem  $\text{Cl}^-$  kanálů lze nalézt vztah, který lze zapsat pomocí racionální funkce.

Bestrophin – 2 byl identifikován jako jedna z látek, které mohou být odpovědné za  $\text{Cl}^-$  proud. Myši, jimž chybí bestrophin – 2, vykazovaly poruchu čichu, není ovšem známo, zda se u těchto myší vyskytuje  $\text{Cl}^-$  proud, či zda je potřeba pro normální čich. Jsou známy farmakologické inhibitory  $\text{Cl}^-$  kanálů.

#### 4.8. Zpětná negativní vazba $\text{Ca}^{2+}$

Vazbou mezi intracelulárním  $\text{Ca}^{2+}$  a kalmodulinem vznikne kalmodulin s navázaným  $\text{Ca}^{2+}$ , který třemi způsoby působí negativně na čichovou signální dráhu. Prvním způsobem je přímé navázání a zablokování CNG kanálů. Druhým způsobem je aktivace kalmodulin kinázy typu II, která inhibuje adenylát cyklázu. Poslední zpětná negativní vazba je posílení činnosti fosfodiesterázy, která rozkládá cAMP. Toto všechno ve výsledku zmenšuje, až ukončuje receptorový proud čichového neuronu.



**Obr. 3** – Zpětná negativní vazba Ca<sup>2+</sup>

Odorant vázající se na receptor způsobuje produkci cAMP, která otevírá CNG kanály. Kalmodulin (CaM) reaguje s vtékajícím Ca<sup>2+</sup> za vzniku CaM<sub>4</sub>, který inhibuje CNG kanály, což je zpětná negativní vazba (tlustá šipka). Zbytek jsou zpětné vazby včetně zvýšení aktivity fosfodiesterázy (PDE) CaM<sub>4</sub> a CaM<sub>4</sub> aktivovanou kalmodulin kinázou typu II (CaMKII), která snižuje produkci cAMP (slabé šipky). Převzato z Reidl 2006.

## 4.9. Kalmodulin

Kalmodulin je vápník vázající protein, který dovede navázat 4 molekuly Ca<sup>2+</sup>. Kalmodulin se 4 navázanými molekulami Ca<sup>2+</sup> je schopný aktivovat kalmodulin kinázu, stimulovat fosfodiesterázu či inhibovat CNG kanály. Inhibice CNG kanálů probíhá tak, že kalmodulin se naváže na N – konec podjednotky CNGA2 a přeruší interakci mezi C a N koncem, čímž zablokuje kanál (Trudeau 2003).

## 4.10. Kalmodulin kináza typu II

Kalmodulin kináza typu II je protein skládající se ze 4 monomerních podjednotek. Kalmodulin s navázaným Ca<sup>2+</sup> je aktivátorem kalmodulin kinázy typu II, přičemž spolu vytváří komplex. Kalmodulin kináza zůstává aktivní i po poklesu koncentrace Ca<sup>2+</sup>, což má za následek odpoutání kalmodulinu s navázaným Ca<sup>2+</sup>. Když je aktivní, fosforyluje adenylyl cyklázu, díky čemuž se snižuje produkce cAMP (Tristan 2007).



#### 4.11. Fosfodiesteráza

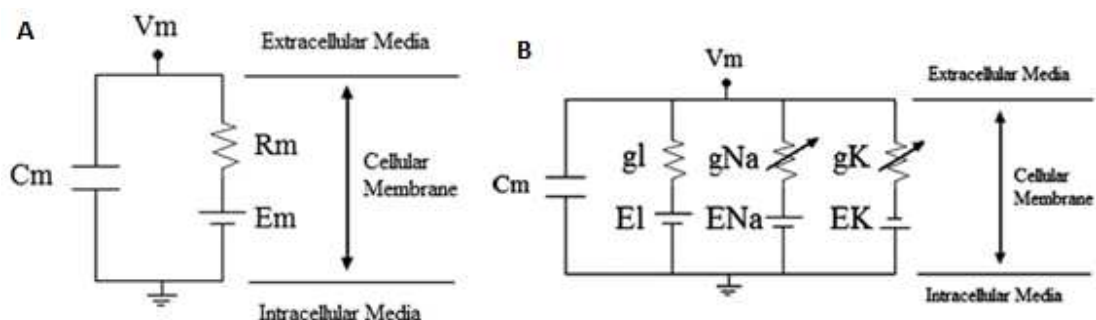
V čichových sensorických neuronech se vyskytují 2 fosfodiesterázy, a to PDE1C, která se nachází v čichové řasince a je citlivá na  $\text{Ca}^{2+}$  navázaný na kalmodulinu, a PDE4A, která se nachází v celém těle čichového neuronu a je na  $\text{Ca}^{2+}$  nezávislá. Obě se podílejí na katabolismu cAMP. Zpomalení ukončování akčního potenciálu bylo však prokázáno pouze v případě, že byly poškozeny geny pro obě fosfodiesterázy. Jako vysvětlení tohoto bylo nabídnuto, že cAMP difunduje z řasinky do těla buňky, kde PDE4A rozkládá cAMP, což je ale rychlejší než inhibice CNG kanálu kalmodulinem s navázaným  $\text{Ca}^{2+}$ . Poslední výzkumy ukazují, že PDE1C se podílí na adaptaci čichového neuronu na opakovanou stimulaci (Cygner 2009).

## 5. Biofyzikální modely

V minulosti byla většina modelů zaměřena na elektrické vlastnosti neuronů, což lze odůvodnit snadnějším měřením experimentálních dat. Později začaly vznikat i modely na molekulární, buněčné či systémové úrovni, avšak většinou se zde naráželo na velkou výpočetní složitost těchto modelů. I přes tyto obtíže ale dávají modely náhled na fungování čichového neuronu či celé čichové dráhy a umožňují formulovat nové poznatky, které lze později experimentálně ověřovat. Modely čichového neuronu a čichové dráhy většinou vycházejí z obecných modelů neuronů a nervové soustavy a lze je rozdělit do těchto čtyř skupin: pasivní modely, aktivní modely, síťové modely a biochemické modely.

### 5.1. Pasivní a aktivní modely

Pasivní a aktivní modely jsou nejzákladnější biofyzikální modely, které se snaží zachytit nejzákladnější vlastnosti buněčné membrány. Membrána je zde modelována pomocí obyčejných diferenciálních rovnic, jako jednoduchý elektrický obvod obsahující kondenzátory, zdroje a odpory, přičemž tyto obvody jdou následně propojovat a řetězit. Aktivní modely na rozdíl od pasivních ještě obsahují aktivně řízené iontové kanály, které mohou měnit svůj stav.



Obr. 4 – Schéma pasivního a aktivního modelu

A) Schéma jednoduchého pasivního modelu vyjádřeného jako jednoduchý RC obvod. B) Schéma modelu Hodgkin a Huxley vysvětlující vznik akčního potenciálu na membráně jako příklad jednoduchého aktivního modelu. Převzato z de Souza 2007.

Tyto modely jsou užitečné pro pochopení základních elektrických vlastností neuronu jako třeba šíření receptorového a synaptického akčního potenciálu do všech částí buňky u pasivních modelů. Základní pasivní model řasinky má tyto parametry pro klidové potenciály:  $E_{Na} = +1 \text{ mV}$ ,  $E_K = -24 \text{ mV}$ ,  $E_{Ca} = +156 \text{ mV}$  a  $E_{Cl} = 0 \text{ mV}$  (Reuter 1998). Klidový potenciál membrány je přitom  $-75 \text{ mV}$  a při odpovědi na odorant stoupá až na  $+2 \text{ mV}$ . V jednom z pasivních modelů (Rospars 1996) byl čichový neuron modelován jako podlouhlý válec rozdělený do 3 oblastí: čichové řasinky, těla a axonu. Cílem tohoto modelu bylo zkoumání kódování intenzity odorantů. Z tohoto vycházel další model (Vermeulen 1998), který dokázal souvislost mezi přítomností mnohobuněčných pomocných buněk a reakcí čichového neuronu na širší rozsah koncentrací odorantů, avšak měl nižší citlivost k malým koncentracím odorantů. Dále lze pomocí něj zkoumat prostorové a časové sumace podprahových potenciálů přicházejících do neuronu. Také tento typ pasivního modelu umožnil ukázat, že 2 čichové neurony spojené gap junction se mohou chovat jako jedna buňka s dvojnásobnou kapacitou membrány (Delay 2003), a umožnil formulaci hypotézy, že tento fakt nehraje zásadní roli pro kódování čichových neuronů. Avšak většinou aktivní modely nalézají uplatnění při modelování jiných částí čichové dráhy, než je čichová řasinka, například čichového bulbu (Bhala 1993). Většinu těchto věcí je poté snadné ověřit experimentálními daty získanými za stejných podmínek a takto ladit parametry modelu. Bohužel nám tyto modely poskytují jen částečný obraz vlastností neuronů, avšak jsou užitečné díky mnohem snazšímu zisku potřebných experimentálních dat.

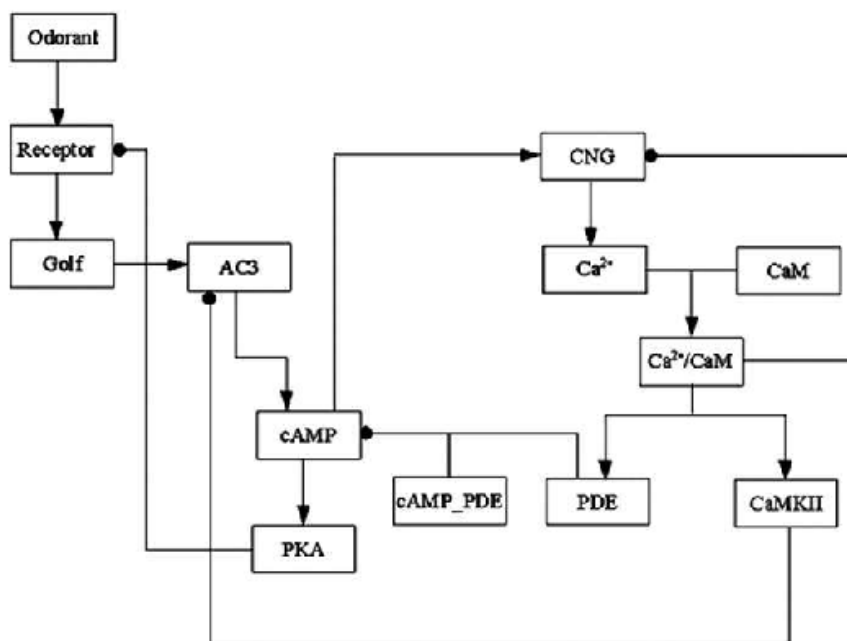
## 5.2. Síťové modely

Síťové modely bývají postaveny na jiných modelech, aktivních, pasivních či biochemických, které se buď vhodně zjednoduší, kvůli snížení výpočetní složitosti, pokud je třeba, či se použijí v původní podobě a z nich se sestaví neuronová síť, která do co největší míry kopíruje experimentální poznatky o čichové dráze. Tyto modely zde nebudou podrobněji popsány, jelikož dávají přehled o fungování čichové dráhy,

důležitosti jednotlivých synaptických spojení a samostatných populací neuronů, čímž se tato práce nezabývá.

### 5.3. Biochemické modely

Biochemické modely se rozdělují do dvou směrů. Prvním z nich jsou molekulové interakce jednotlivých molekul, které jsou ovšem velmi výpočetně náročné a jsou počítány jen s omezeným počtem molekul na superpočítačích. Toho bylo využito ke studiu receptorů čichové řasinky (Floriano 2004). Druhou, rozšířenější možností je zaměření se na koncentrace jednotlivých iontů čichové dráhy (Halnes 2009, Reidl 2006 viz dále). Jelikož se v poslední době rozvinuly experimentální metody, což umožňuje získávat konstanty, např. pro rychlosti reakcí, což byl hlavní problém u biochemických modelů, začaly se tyto modely více rozvíjet. Většinou se vezme část čichové dráhy, jelikož i přes rozvoj experimentálních metod je stále problematické získat některé kinetické konstanty, kde je chemická kinetika důkladně rozebrána pomocí diferenciálních rovnic a následně modelována. Jednou z dalších možností, která u těchto modelů může, ale nemusí být využita, je popis difúze, na což se využívá Ners-Plankova rovnice, popisující difúzi nabitých částic. Příkladem použití těchto rovnic je model, který předkládá hypotézu, že tvar řasinky má velký vliv na iontový transport (Lindemann 2001). Dosud ještě není zpracován komplexní model, který by pokrýval celou dráhu čichové transdukce, jsou pouze modely, které pokrývají různé úseky této dráhy a některé z nich budou popsány dále (Halnes 2009, Reidl 2006).



**Obr. 5** – Schéma signální transdukce

Schematické zobrazení signální transdukce v čichovém senzoričeském neuronu, kde šipka znamená kladnou reakci (aktivaci, vtok...) a kolečko znamená negativní reakci (inhibici, degradaci...). Převzato z de Souza 2007.

#### 5.4. Model oscilace vápníku díky zpětné negativní vazbě v čichových řasinkách

Jeden z těchto modelů je popsán v článku Model of Calcium Oscillation Due to Negative Feedback in Olfactory Cilia (Reisert 2006). Tento model se zabývá oscilacemi vápníku, což má za následek negativní zpětnou vazbu, který se po vtoku CNG kanály naváže na kalmodulin a následně blokuje CNG kanály, což hraje roli v rychlé adaptaci. Model je postaven na 4 reakčních rovnicích a dalších dvou omezujících podmínkách, což znamená, že pouze 4 z 6 neznámých jsou nezávislé. Toto vede k 4 provázaným obyčejným diferenciálním rovnicím. Parametry tohoto modelu byly zkoumány pomocí stechiometrické síťové analýzy (Clarke 1988), s jejíž pomocí se zkoumaly Hopfovy bifurkace. Zjištěné rychlostní konstanty byly poté ověřovány tak, že se zkoumalo, zda je model konzistentní s experimentálními daty (Reisert 2001, Leinders-Zufall 1998). Tento model se snaží dokázat hypotézu, že k rychlé adaptaci stačí přímá negativní vazba. V čichových řasinkách jsou 3 kalmodulinem zprostředkované negativní zpětné vazby,

přičemž všechny můžou vést k adaptaci. Dráha přes inhibici AC III je pomalejší než přímá zpětná vazba (Wei 1998), která může způsobovat oscilace s periodou v řádu sekund. Časové rozpětí potřebné pro dráhu skrz degradaci cAMP je nejspíše pomalejší, jelikož jeho poslední krok zahrnuje odpojení cAMP od CNG kanálů a jeho degradaci. Navíc je tato dráha na rychlou adaptaci příliš slabá (Kurashi 1997). V buněčných částech s úložišti intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  můžou být oscilace způsobené i vápníkem indukovaným vypouštěním vápníku (CICR). CICR však na rozdíl od zpětné negativní vazby, bez zpětné pozitivní vazby, zapřičiňuje vznik excitability. Tento model vykazuje známky adaptace, avšak bez toho aby vykazoval další známky excitability. Tento model nabízí ještě do budoucna rozšíření, jako zahrnutí dráhy s degradací cAMP a CICR, za vzniku komplexnějších oscilací, či zahrnutí difúze do modelu.

### **5.5. Modelování a analýza citlivosti reakcí zahrnující receptory, G proteiny a efekторы v čichových senzoričkých neuronech obratlovců**

Další z modelů je popsán ve článku Modelling and sensitivity analysis of the reactions involving receptor, G-protein and effector in vertebrate olfactory receptor neurons (Reidl 2006). Objektem zájmu tohoto modelu je počátek transdukcce, od navázání odorantu až k spuštění AC typu III a vytvoření cAMP. V tomto modelu je všech 7 chemických reakcí přepsáno do 9 diferenciálních rovnic s 11 proměnnými, dle kterých je poté model modelován. Parametry tohoto modelu jsou dány 10 rychlostními konstantami a 3 počátečními koncentracemi reaktantů. Data pro tento model byla převzata z práce TK05 (Takeuchi 2005) a práce D05 (Dougherty 2005). Tento model byl vytvořen až poté, co byl obdobný model vytvořen pro počátek transdukcce u hmyzu R07 (Rospears 2007) a je s tímto modelem i srovnáván, přičemž 6 rychlostních konstant bylo z tohoto modelu převzato přímo, díky podobnosti vnitřní kinetiky čichové řasinky mezi obratlovcem a hmyzem. Ostatní rychlostní konstanty byly voleny tak, aby co nejlépe korespondovaly s daty TK05 a D05. Přesto, že se tento model soustředí na počátek transdukcce, počáteční události transdukcce jako difúze odorantu přes hlen a vazba na OBP jsou zde zanedbány. Parametry modelu se přibližně shodují s údaji z literatury

(pokud jsou k dispozici) a jsou biologicky pochopitelné. Hypotézy, které plynou z tohoto modelu, jsou ve shodě s empirickými poznatky transdukce. Tyto skutečnosti podporují fakt, že se tímto modelem podařilo zachytit podstatu začátku čichové transdukce. Vzhledem k tomu, že tento model byl kalibrován i daty D05, tak jím lze nahradit počátek modelu D05, čímž vznikne přesnější model celé transdukce, což je možný vývoj do budoucna. V souladu s TK05 bylo zjištěno, že zesílení signálu čichové transdukce je velmi malé oproti obdobné dráze v tyčinkách fotoreceptorů, kde je 250 000 molekul cAMP na jeden foton. Zesílení je zhruba 160 – ti násobek, přičemž toto číslo zůstává stejné v širokém rozsahu koncentrací odorantu. Toto zesílení u obratlovců je zhruba 4 krát větší než zesílení u hmyzu (Rospears 2007). Pro většinu testovaného rozsahu byla také zjištěna velká citlivost na následující 4 parametry na produkci cAMP: počáteční hustotu G proteinů, rychlostní konstantu pro produkci cAMP, rychlostní konstantu pro rozpad receptor-ligandového komplexu a rychlostní konstantu pro aktivaci-deaktivaci efektoru. Celý tento model byl modelován pomocí MATLABU.

## 6. Softwarové nástroje pro počítačovou simulaci

### 6.1. Neuron

Neuron je simulační prostředí navržené hlavně pro data-driven modely neuronů a neuronových sítí. Má ovšem také některé vlastnosti, které z něj dělají dobrý simulační nástroj pro modelování biofyzikálních detailů neuronů či neuronových sítí. Jednou z těchto vlastností je existence většího množství doplňků, které rozšiřují jádro programu a oddělují biologické aspekty modelů od skryté vrstvy numeriky. Jedním z těchto rozšíření je i NMODL, který umožňuje lépe popsat děje na membráně počínaje napětíově a ligandem řízenými iontovými kanály, což dává velké možnosti pro popis kinetiky iontů. Jednou z dalších silných věcí Neuronu je dobře navržené uživatelské prostředí, které umožňuje vytvářet i pokročilejší modely bez nutnosti psaní skriptů. V čichové dráze jsou v tomto simulačním prostředí nejčastěji modelovány vlastnosti a funkce čichových neuronů v bulbu. Jeden z těchto modelů nám předkládá kompartmentový model mitrálních a granulórních buněk (Aradi 1996) či model celého bulbu s tím, že byly zkoumány dendritické inhibice mitrálních buněk (Davison 2003).

### 6.2. Genesis

Genesis je simulační prostředí navržené hlavně pro detailní conductance-based modely neuronů, přičemž ale umožňuje modelovat celé spektrum od biochemických reakcí, přes kompartmentové modely neuronů až po velké neuronové sítě. I přes tuto schopnost se však většina modelů a doplňků zaměřuje na fyziologické a anatomické detaily a předvídání vlastností, které lze experimentálně otestovat. Jeden z těchto modelů také zkoumá vliv přítomnosti gap junction v čichovém epitelu (de Souza 2004). Modely v tomto prostředí jsou stavěny objektově, s tím, že desítky objektů jsou předdefinovány a mohou být snadno upraveny, a není ani těžké další objekty dodefinovat. Toto umožňuje snadnou výstavbu kompartmentových modelů, například čtyř kompartmentový model bipolárního čichového sensorického neuronu (de Souza 2002). Mezi význačné doplňky patří Kinetikit, který přidává objekty pro lepší



modelování kinetiky a čtyři různé typy stochastických biochemických simulací (Vayttaden 2004).

### 6.3. Matlab

Poslední z hojněji využívaných simulačních prostředí je Matlab či jeho Open Source varianta GNU Octave. Je to skriptovací interpretovaný jazyk s dobře zpracovaným matematickým základem, což umožňuje značné zjednodušení psaných modelů oproti klasickým programovacím jazykům jako Java, C++ či C#. K tomuto programu se dají hojně najít skripty či Toolboxy, které usnadňují tvorbu modelu díky již implementovaným funkcím. Mezi jeho výhody patří i to, že díky tomu, že je hojně využíván ve velkém počtu technických oborů, má dobře zpracované Toolboxy, které umožňují analýzu dat ve stejném jazyce, jako byl napsán model. Byl použit například na analýzu toho, jak reagují sensorické neurony nejenom na odorant, ale i na mechanické stimuly (Grosmaître 2007) či na dříve rozebíraný model začátku transdukce (Halnes 2009).

### 6.4. Porovnání softwarových nástrojů

Pro modelování čichové transdukce jsou použitelné všechny 3 dříve zmíněné softwarové nástroje, avšak každý má své výhody a nevýhody v tomto použití. Neuron se hodí hlavně na modely buněk či neuronových sítí, kde je potřeba obsáhnout větší množství morfologických a elektrofyziologických detailů. Genesis je používáno hlavně pro detailní modely neuronů či jejich částí, například díky snadné tvorbě kompartmentového modelu neuronu, díky objektové orientaci, či specializovaným objektům pro biochemické reakce. Matlab je univerzální, avšak jeho nedostatkem a současně i výhodou je, že se většina modelů začíná z větší části tvořit od začátku a nejsou používány přeprogramované funkce jako v Neuronu a Genesis, které sice práci usnadňují, avšak také omezují svým rozsahem použití. Po uvědomění si těchto věcí je zřejmé, že všechny 3 nástroje mají své místo v modelování čichové transdukce, avšak každý se hodí pro jiné konkrétní problémy.

## 7. Závěr

Objasnění mechanismů, které se podílí na čichové transdukci za různých podmínek, je naprosto nezbytné pro porozumění čichu jako komplexnímu smyslu. Základní molekulární mechanismy čichové transdukce jsou sice známy, avšak nejsou kvantitativně popsány. Již v minulosti se v této oblasti využívaly modely, avšak většinou jen pro modelování elektrických vlastností čichového neuronu, nikoliv pro modelování signální dráhy. V této oblasti se můžou velmi dobře uplatnit biofyzikální modely, které se v poslední době rozvíjejí díky lepším experimentálním metodám umožňujícím získat potřebná experimentální data. I přes tento rozvoj však nejsou kvantitativní modely popisující dobře celou dráhu signální transdukce, pouze její části, což předurčuje jeden ze směrů budoucího vývoje.

Cílem této práce bylo vypracovat literární přehled principů, které se mohou uplatnit při modelování signální dráhy čichových sensorických neuronů, což zahrnuje jak detailní popis signální dráhy z hlediska molekulární biologie, tak popis jednotlivých modelů a simulačních prostředí. Jelikož tato oblast je většinou považována za mezioborovou disciplínu, nezabývá se jí větší množství prací. Většina prací se zabývá tímto tématem z jedné či druhé strany, čemuž se v této práci snažím vyhnout.

## 8. Seznam literatury

ARADI, Ildiko a Peter ERDI. Multicompartmental modeling of the olfactory bulb. *Cybernetics and Systems: An International Journal*. 1996, roč. 27, č. 6, s. 605-615.

BHALLA, Upinder Singh a James M. BOWER. Exploring parameter space in detailed single neuron models: simulations of the mitral and granule cells of the olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*. 1993, roč. 69, č. 6, s. 1948-1965.

BHALLA, Upinder Singh a VAYTTADEN. Developing Complex Signaling Models Using GENESIS/Kinetikit. *Science Signaling: The Signal Transduction Knowledge Environment*. 2004, č. 219.

BISKUP, Christoph, Jana KUSCH, Eckhard SCHULZ, Vasilica NACHE, Frank SCHWEDE, Frank LEHMANN, Volker HAGEN a Klaus BENNDORF. Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature*. 2007, č. 446, s. 440-443. ISSN 00280836.

BOWER, James M. a David BEEMAN. *The book of GENESIS: exploring realistic neural models with the GEneral NEural SIMulation System*. 2nd ed. Santa Clara, Calif.: TELOS, 1998, xxiv, 458 p. ISBN 03-879-4938-0.

CARNEVALE, Nicholas T. a Michael L. HINES. *The NEURON book*. New York: Cambridge University Press, 2006, xix, 457 p. ISBN 05-218-4321-9.

CLARKE, Bruce L. Stoichiometric network analysis. *Cell Biophysics*. 1988, č. 12, s. 237-253.

COROTTO, Frank S., David R. PIPER, Nansheng CHEN a William C. MICHEL. VOLTAGE- AND Ca<sup>2+</sup>-GATED CURRENTS IN ZEBRAFISH OLFACTORY

RECEPTOR NEURONS. *The Journal of Experimental Biology*. 1996, č. 199, s. 1115-1126.

CYGNAR, Katherine D. a Haiqing ZHAO. Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons. *Nature Neuroscience*. 2009, č. 12, s. 454-462.

DAVISON, Andrew P., Jianfeng FENG a David BROWN. Dendrodendritic Inhibition and Simulated Odor Responses in a Detailed Olfactory Bulb Network Model. *Journal of Neurophysiology*. 2003, roč. 90, č. 3, s. 1921-1935.

DE SOUZA, Fabio Marques Simoes a Gabriela ANTUNES. Biophysics of olfaction. *Reports on Progress in Physics*. 2007, č. 70, s. 451-491.

DELAY, Rona J. a Vincent E. DIONNE. Coupling between Sensory Neurons in the Olfactory Epithelium. *Chemical Senses*. 2003, roč. 28, č. 9, s. 807-815.

DOUGHERTY, Daniel P., Geraldine A. WRIGHT a Alice C. YEW. Computational model of the cAMP-mediated sensory response and calcium-dependent adaptation in vertebrate olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, č. 102, s. 10415-10420.

DZEJA, Claudia, Volker HAGEN, U.Benjamin KAUPP a Stephan FRINGS. Ca<sup>2+</sup> permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *The EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 1999, č. 18, s. 131-144. ISSN 02614189.

FLORIANO, Wely B., Nagarajan VAIDEHI a William A. Goddard GODDARD III. Making Sense of Olfaction through Predictions of the 3-D Structure and Function of Olfactory Receptors. *Chemical Senses*. 2004, roč. 29, č. 4, s. 269-290.

GLEESON, Pdraig, Angus SILVER, Volker STEUBER, Vassilis CUTSURIDIS, Bruce GRAHAM, Stuart COBB, Imre VIDA. Computer Simulation Environments. *Hippocampal Microcircuits: A Computational Modeler's Resource Book*. 2010, č. 5, s. 593-606.

GONZALEZ-SANZ, Tristan. *Expression, location, and activation of CaMKII in the Olfactory Bulb*. Florida (USA), 2007. Bakalářská práce. The Florida State University - College of Arts and Sciences.

GROSMAITRE, Xavier, Lindsey C. SANTARELLI, Jie TAN, Minmin LUO a Minghong MA. Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nature Neuroscience*. 2007, č. 10, s. 348-354.

HALNES, Geir, Erik ULFHELM, Emma Eklöf LJUNGGREN, Jeanette Hellgren KOTALASKI a Jean-Pierre ROSPARS. Modelling and sensitivity analysis of the reactions involving receptor, G-protein and effector in vertebrate olfactory receptor neurons. *Journal of Computational Neuroscience*. 2009, č. 27, s. 471-491.

HINES, M. L. a N. T. CARNEVALE. The NEURON Simulation Environment. *Neural Computation*. 1997, roč. 9, č. 6, s. 1179-1209.

HODGKIN, Alan L. a Andrew F. HUXLEY. A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *The Journal of Physiology*. 1952, č. 117, s. 500-544.

JONES, David T. a Randall R. REED. Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*. 1989, roč. 244, č. 4906, s. 790-795.

KLEENE, Steven J. The Electrochemical Basis of Odor Transduction in Vertebrate Olfactory Cilia. *Chemical Senses*. 2008, č. 33, s. 839-859.

KURAHASHI, Takashi a Akimichi KANEKO. Gating properties of the cAMP-gated channels in toad olfactory receptor cells. *Journal Physiology*. 1993, č. 446, s. 287-302.

KURAHASHI, Takashi a Anna MENINI. Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature*. 1997, č. 385, s. 725-729.

LEINDERS-ZUFALL, Trese, Charles A. GREER, Gordon M. SHEPHERD a Frank ZUFALL. Imaging Odor-Induced Calcium Transients in Single Olfactory Cilia: Specificity of Activation and Role in Transduction. *The Journal of Neuroscience*. 1998, roč. 18, č. 15, s. 5630-5639.

LINDEMANN, Bernd. Predicted profiles of ion concentrations in the olfactory cilia in the steady state. *Biophysical Journal*. 2001, roč. 80, č. 4, s. 1712-1721.

MYSLIVEČEK, Jaromír. *Základy neurovědy*. 2., rozš. a přeprac. vyd. Praha: Triton, 2009, 390 s. ISBN 978-807-3870-881.

REIDL, J., P. BOROWSKI, A. SENSSE, J. STARKE, M. ZÁPOTOCKÝ a M. EISWIRTH. Model of Calcium Oscillations Due to Negative Feedback in Olfactory Cilia. *Biophysical Journal*. 2006, č. 90, s. 1147-1155.

REISERT, Johannes, Paul J. BAUER, King-Wai YAU a Stephan FRINGS. The Ca-activated Cl Channel and its Control in Rat Olfactory Receptor Neurons. *The Journal of General Physiology*. 2003, roč. 112, č. 3, s. 349-364.

REISERT, Johannes a Hugh R. MATTHEWS. Simultaneous recording of receptor current and intraciliary  $Ca^{2+}$  concentration in salamander olfactory receptor cells. *The Journal of Physiology*. 2001, roč. 535, č. 3, s. 637-645.

REUTER, Dirk, Karl ZIEROLD, Walter H. SCHRÖDER a Stephan FRINGS. A Depolarizing Chloride Current Contributes to Chemolectrical Transduction in

Olfactory Sensory Neurons In Situ. *The Journal of Neuroscience*. 1998, roč. 18, č. 17, s. 6623-6630.

RONNETT, Gabriele V. a Cheil MOON. G Proteins and Olfactory Signal Transduction. *Annual Review of Physiology*. 2002, č. 64, s. 189-222.

ROSPARS, Jean Pierre, Petr LÁNSKÝ, Henry C. TUCKWELL a Arthur VERMEULEN. Coding of odor intensity in a steady-state deterministic model of an olfactory receptor neuron. *Journal of Computational Neuroscience*. 1996, roč. 3, č. 1, s. 51-72.

ROSPARS, Jean-Pierre, Philippe LUCAS a Mathieu COPPEY. Modelling the early steps of transduction in insect olfactory receptor neurons. *Biosystems*. 2007, roč. 89, 1–3, s. 101-109. ISSN 03032647.

SIMES-DE-SOUZA, Fábio M. a Antônio C. ROQUE. Self-sustained waves in a computational model of the olfactory epithelium with gap junctions. *Neurocomputing*. 2004, 58–60, s. 1033-1039.

SIMES-DE-SOUZA, Fábio M. a Antonio C. ROQUE. Simulation of a vertebrate receptor cell of the olfactory epithelium for use in network models. *Neurocomputing*. 2002, 44–46, s. 177-182.

TAKEUCHI, Hiroko a Takashi KURAHASHI. Mechanism of Signal Amplification in the Olfactory Sensory Cilia. *The Journal of Neuroscience*. 2005, roč. 25, č. 48, s. 11084-11091.

TRAPPENBERG, Thomas P. *Fundamentals of computational neuroscience*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2010, xxv, 390 p. ISBN 01-995-6841-3.

TRUDEAU, Matthew C. a William N. ZAGOTTA. Calcium/Calmodulin Modulation of Olfactory and Rod Cyclic Nucleotide-gated Ion Channels. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2003, roč. 278, č. 21, s. 18705-18708.

VAYTTADEN, Sharat Jacob a Upinder Singh BHALLA. Developing Complex Signaling Models Using GENESIS/Kinetikit. *Science Signaling: The Signal Transduction Knowledge Environment*. 2004, č. 219.

VERMEULEN, Arthur a Jean Pierre ROSPARS. Dendritic Integration in Olfactory Sensory Neurons: A Steady-State Analysis of How the Neuron Structure and Neuron Environment Influence the Coding of Odor Intensity. *Journal of Computational Neuroscience*. 1998, roč. 5, č. 3, s. 243-266.

WEI, Jia, Allan Z. ZHAO, Guy C.K. CHAN, Lauren P. BAKER, Soren IMPEY, Joseph A. BEAVO a Daniel R. STORM. Phosphorylation and Inhibition of Olfactory Adenylyl Cyclase by CaM Kinase II in Neurons: a Mechanism for Attenuation of Olfactory Signals. *Neuron*. 1998, roč. 21, č. 3, s. 495-504.

WONG, Scott T., Kien TRINH, Beth HACKER, Guy C.K. CHAN, Graeme LOWE, Anuj GAGGAR, Zhengui XIA, Geoffrey H. GOLD a Daniel R. STORM. Disruption of the Type III Adenylyl Cyclase Gene Leads to Peripheral and Behavioral Anosmia in Transgenic Mice. *Neuron*. 2009, roč. 27, č. 3, s. 487-497. ISSN 08966273.

ZHAINAZAROV, A.B., M. SPEHR, C.H. WETZEL, H. HATT a B.W. ACHE. Modulation of the Olfactory CNG Channel by PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. *The Journal of Membrane Biology*. Springer-Verlag, 2004, roč. 201, č. 1, s. 51-57. ISSN 00222631.

ZHENG, Jie a William N. ZAGOTTA. Stoichiometry and Assembly of Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Neuron*. 2004, roč. 42, č. 3, s. 411-421. ISSN 08966273.