

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Fyziologie živočichů

Katedra fyziologie



**Mgr. Štěpána Boukalová**

**Mechanismy aktivace a modulace vaniloidních TRP receptorů**

Mechanisms of activation and modulation of vanilloid TRP channels

**Dizertační práce**

Pracoviště: Fyziologický ústav Akademie věd České republiky v.v.i.

Oddělení buněčné neurofyziologie

Vedoucí práce: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Práce vznikla za podpory projektů GAUK 26110/2010 a GAUK 500512/2012.

V Praze, 18.9.2013

Podpis:

*Ráda bych poděkovala své školitelce dr. Viktorii Vlachové nejen za odborné vedení, ale také za vstřícnost a vytvoření skvělých pracovních podmínek. Velký dík patří rovněž ing. Janu Teisingerovi za odborné konzultace a podněty, ing. Ivanu Dittertovi za pomoc při řešení nejrůznějších technických problémů a Magdě Kuntošové za udržování plynulého chodu laboratoře. Všem svým kolegům a kolegyním z Oddělení buněčné neurofyzologie děkuji za přátelskou pracovní atmosféru.*

*ŠB*

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRAKT.....</b>	<b>8</b>
<b>1 TEORETICKÝ ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
1.1 Rodina TRP receptorů.....	10
1.2 TRPV1 receptor.....	10
1.2.1 TRPV1 iontový kanál – receptor bolesti.....	10
1.2.2 Farmakologie TRPV1 receptoru.....	11
1.2.2.1 Analgetické působení agonistů TRPV1 receptoru.....	11
1.2.2.2 Analgetické působení antagonistů TRPV1 receptoru.....	12
1.2.3 Strukturní charakteristiky TRPV1 proteinového komplexu.....	13
1.2.3.1 Cytozolická N-koncová doména.....	14
1.2.3.2 Cytozolická C-koncová doména.....	15
1.2.3.3 Transmembránová doména.....	16
1.2.4 Mechanismus účinku agonistů TRPV1 receptoru.....	19
1.2.4.1 Napětový senzor.....	19
1.2.4.2 Vazebná místa agonistů.....	20
1.2.4.3 Teplotní senzor.....	21
1.2.4.4 Vazebná místa protonů.....	22
1.3 TRPV3 receptor.....	24
1.3.1 Fyziologická funkce TRPV3 receptorů.....	25
1.3.1.1 Úloha TRPV3 receptoru jako teplotního senzoru organismů.....	25
1.3.1.2 Úloha TRPV3 receptoru ve fyziologii a patofyziologii kůže.....	26
1.3.2 Aktivační vlastnosti TRPV3 receptorů.....	27
1.3.3 Intracelulární signalizační dráhy ovlivňující činnost TRPV3 receptorů.....	28
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>30</b>
<b>3 METODY.....</b>	<b>31</b>
3.1 Buněčné kultury.....	31
3.1.1 Kultivace a transfekce HEK293T buněk.....	31
3.1.2 Kultivace a transfekce HaCaT buněk.....	32
3.2 Mutageneze.....	32
3.3 Elektrofyzilogická snímání.....	33
3.4 Experimentální roztoky a chemikálie.....	34
3.4.1 Extracelulární roztok.....	35
3.4.2 Intracelulární roztok.....	35
3.4.3 Látky aplikované při elektrofyzilogických experimentech.....	35
3.4.4 Látky potřebné pro molekulárně-biologické experimenty.....	36
3.5 Použitý software.....	36
3.6 Hodnocení záznamů.....	36

3.6.1	Časový průběh nástupu odpovědi TRPV1 receptoru.....	36
3.6.2	Hodnocení napěťové citlivosti .....	38
3.6.3	Hodnocení teplotní citlivosti .....	39
3.7	Statistická analýza.....	39
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Úloha S1 transmembránové oblasti ve funkčních vlastnostech TRPV1 iontového kanálu ....</b>	<b>41</b>
4.1.1	Mutační analýza TRPV1–S1 .....	41
4.1.2	Úloha kladně nabitého rezidua v extracelulární části S1 .....	43
4.1.3	Inhibiční působení protonů u spontánně aktivních TRPV1 konstruktů.....	45
4.1.4	Porovnání funkčních vlastností mutantů TRPV1 kanálu necitlivých ke stimulačním účinkům protonů.....	46
4.1.5	Mechanismus inhibičního působení protonů na aktivitu mutantních TRPV1 receptorů.....	53
4.1.6	Úloha alaninových zbytků v extracelulární části TRPV1–S1 .....	55
4.1.6.1	Konzervativní mutace na pozici 452 silně poškozuje funkční vlastnosti TRPV1 iontového kanálu.....	56
4.1.6.2	Zpomalený nástup odpovědi na kapsaicin u konstruktů s mutací na pozicích 451 a 452 .....	57
4.1.6.3	Hystereze vrátkování u mutantních receptorů se záměnou alaninu 452 .....	58
4.1.7	Desenzitizační působení protonů na aktivitu TRPV1 receptoru.....	60
<b>4.2</b>	<b>Modulační účinky epidermálního růstového faktoru na aktivitu TRPV3 receptoru.....</b>	<b>60</b>
4.2.1	Charakterizace funkčních vlastností TRPV3 receptoru.....	61
4.2.2	Účinky EGF na aktivitu endogenních TRPV3 receptorů exprimovaných v HaCaT buňkách....	63
4.2.3	Mechanismus stimulačního působení EGF na aktivitu TRPV3 receptoru .....	64
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>Mutační studie zaměřená na transmembránovou doménu TRPV1 receptoru.....</b>	<b>66</b>
5.1.1	Úloha S1 transmembránové oblasti.....	66
5.1.2	Spontánní aktivita konstruktů s mutací v S1, S4/S4–S5 oblasti a pórovém helixu TRPV1 receptoru.....	68
5.1.3	Mechanismus inhibičního působení protonů u spontánně aktivních TRPV1 konstruktů.....	69
5.1.4	Hystereze vrátkování u mutantních a přirozených forem TRPV1 iontových kanálů .....	70
<b>5.2</b>	<b>Aktivace a modulace endogenních TRPV3 receptorů exprimovaných v keratinocytech .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>74</b>
<b>6.1</b>	<b>Závěry mutační studie zaměřené na TRPV1 iontový kanál.....</b>	<b>74</b>
<b>6.2</b>	<b>Závěry studie zaměřené na modulační mechanismy TRPV3 receptorů .....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ.....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>CITOVANÁ LITERATURA.....</b>	<b>77</b>

## SEZNAM ZKRATEK

2-APB	2-aminoetoxydifenylborát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
C-konec	karboxylový konec proteinu
cDNA	komplementární DNA syntetizovaná z templátu mRNA
DAG	1,2-diacylglycerol
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EGTA	ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem
FTS	fetální telecí sérum
GFP	zelený fluorescenční protein
GIT	gastrointestinální trakt
HaCaT	linie imortalizovaných lidských keratinocytů
HEK293T	linie lidských embryonálních ledvinných buněk
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazin ethansulfonová kyselina
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfát
IP <sub>3</sub> receptory	receptory pro inositol-1,4,5-trifosfát
Kaps 1	1 μM roztok kapsaicinu
Kaps 10	10 μM roztok kapsaicinu
K <sub>v</sub> kanály	napětově ovládané draslíkové kanály
LB médium	médium „Lysogeny Broth“
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkináza
MEK	mitogeny aktivovaná proteinkináza kináza
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
N-konec	aminový konec proteinu
NF	nefunkční konstrukty
NO	oxid dusnatý

PBS	fosfátový pufr; „phosphate buffered saline“
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PLC	fosfolipáza C
$Q_{10}$	teplotní koeficient
TGF- $\alpha$	transformující růstový faktor- $\alpha$
TM	transmembránový
TRP	„transient receptor potential“

## ABSTRAKT

TRPV1 a TRPV3 receptory jsou teplocitlivé iontové kanály patřící do rodiny vaniloidních TRP receptorů. TRPV1 receptor, jenž je specificky exprimován v nociceptivních neuronech, představuje klíčovou molekulu v transdukční dráze bolestivých podnětů, včetně nociceptivního tepla. Význam TRPV3 receptorů ve vnímání tepelných podnětů je prozatím sporný, dobře prokázána je však jeho úloha v regulaci proliferace a diferenciaci keratinocytů. TRP receptory, podobně jako napěťově ovládané draslíkové kanály ( $K_v$ ), jsou tvořeny čtyřmi podjednotkami, jež každá obsahuje šest transmembránových segmentů (S1–S6).

V první části své dizertační práce jsem se zaměřila na úlohu S1 transmembránové oblasti ve funkčních vlastnostech TRPV1 receptoru. Z našich výsledků vyplývá, že část S1 směřující do extracelulárního prostředí hraje významnou úlohu ve vrátkování iontového kanálu. Konzervativní mutace kladně nabitého rezidua v dané oblasti (R455K mutace) vedla ke vzniku TRPV1 iontových kanálů se zvýšenou aktivitou, jež však nebyly citlivé ke stimulačnímu působení sníženého pH prostředí. Naopak, zvýšená koncentrace protonů v prostředí vedla ke stabilizaci zavřeného stavu mutantního iontového kanálu. Velmi podobné fenotypické vlastnosti jako u R455K konstruktů jsme pozorovali i u dalších mutantů se záměnou v S4/S4–S5 oblasti a v pórovém helixu. Extracelulární část S1 je u  $K_v$  kanálů v přímém kontaktu s pórovým helixem a zajišťuje efektivní přenos aktivačního signálu z domény napěťového senzoru na pórovou doménu (Lee et al., 2009). Naše výsledky naznačují, že by obdobná interakce mezi S1 a pórovým helixem mohla být klíčová pro správné vrátkování TRPV1 receptoru.

Druhá část mé dizertační práce je zaměřená na stanovení účinku epidermálního růstového faktoru (EGF) na aktivitu TRPV3 receptorů endogenně exprimovaných v linii imortalizovaných lidských keratinocytů – HaCaT. V elektrofyziologických pokusech prováděných na HaCaT buňkách se nám podařilo zaznamenat specifickou aktivitu TRPV3 receptorů vyvolanou aplikací chemických agonistů. Již krátkodobá stimulace buněk EGF vedla k výraznému zvýšení citlivosti TRPV3 iontových kanálů. Při současné inkubaci buněk s inhibitory MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) dráhy byly účinky EGF potlačeny. Stimulační vliv EGF na činnost TRPV3 receptoru je tudíž pravděpodobně zprostředkován aktivací MAPK dráhy.



## ABSTRACT

TRPV1 and TRPV3 are thermosensitive ion channels from the vanilloid subfamily of TRP receptors. TRPV1, which is primarily expressed in nociceptive sensory neurons, is an important transducer of painful stimuli and is also involved in the detection of noxious heat. TRPV3 is expressed mainly in the skin where it regulates proliferation and differentiation of keratinocytes. Similarly to voltage-dependent potassium ( $K_v$ ) channels, TRP receptors are comprised of four subunits, each with six transmembrane segments (S1–S6).

Using mutational approach, we tried to elucidate the role of S1 in TRPV1 functioning. Our results indicate that the extracellular portion of S1 plays a crucial role in TRPV1 gating. TRPV1 channels with a conservative mutation of positively charged residue in this region (R455K substitution) were overactive. However, they were neither activated nor potentiated by low pH; on the contrary, protons stabilized the closed conformation of this mutant channel. Very similar phenotypic properties were found in other TRPV1 mutants with substitution in S4/S5–S5 region and in the pore helix. In  $K_v$  channels, extracellular portion of S1 forms a small contact surface with the pore helix, which allows efficient transmission of conformational changes from the voltage sensor domain to the pore's gate (Lee et al., 2009). We hypothesize that analogous interaction between S1 and the pore helix might be valid for TRPV1 channel gating.

The second part of this thesis focuses on the modulation of the activity of TRPV3 receptors endogenously expressed in immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT) induced by epidermal growth factor (EGF). In patch-clamp experiments, we were able to detect TRPV3-mediated currents in HaCaT cells in response to application of TRPV3 agonists. Short-time incubation of cells in the presence of EGF led to marked increase in TRPV3 sensitivity, which was prevented by addition of MAPK (mitogen-activated protein kinase) inhibitors to the culture medium. Our results indicate that the sensitizing effect of EGF on the activity of TRPV3 is mediated by stimulation of MAPK pathway.

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Rodina TRP receptorů

První zástupce rodiny TRP receptorů byl objeven u octomilek při hledání molekulární podstaty zrakového defektu mutantních jedinců, u kterých dlouhodobé vystavení intenzivnímu světlu vyvolalo pouze přechodnou depolarizaci fotoreceptorů. Bylo zjištěno, že tento fenotyp je způsoben mutací v genu kódující iontový kanál, jenž je důležitou součástí fototransdukční dráhy octomilek (Cosens and Manning, 1969; Montell and Rubin, 1989). Na základě podobnosti sekvencí DNA pak byly objeveny další příbuzné iontové kanály u nejrůznějších živočišných druhů. Dle fenotypu mutantních octomilek byla celá nově objevená rodina proteinů pojmenována „Transient Receptor Potential“ – TRP.

Skupina TRP receptorů se dělí do sedmi podrodin – TRPC (kanonická), TRPV (vaniloidní), TRPM (melastatinová), TRPP (polycistinová), TRPML (mukolipinová), TRPA (ankyrinová) a TRPN (NOMPC – „no mechanoreceptor potential C“). Iontové kanály z rodiny TRP receptorů se účastní transdukce senzoričtých podnětů. Zprostředkovávají citlivost živočichů ke světlu, tepelným i mechanickým podnětům a slouží jako chemoreceptory pro rozmanité látky z prostředí. TRP receptory mají důležitou fyziologickou úlohu i mimo senzoričtý systém a jejich nesprávná činnost je podkladem nejrůznějších patologických stavů (pro přehled viz (Nilius et al., 2007)).

## 1.2 TRPV1 receptor

### 1.2.1 TRPV1 iontový kanál – receptor bolesti

Jednou ze sedmi podrodin TRP receptorů je skupina vaniloidních iontových kanálů – TRPV, která zahrnuje šest vzájemně příbuzných proteinů TRPV1 – 6. Název podrodiny je odvozen od prvně objeveného TRPV1 receptoru, který je aktivován některými látkami s vaniloidní skupinou. Strukturní a funkční vlastnosti jsou nejlépe popsány u TRPV1 receptoru nejen díky jeho prvenství, ale především díky jeho zásadní úloze při transdukci bolestivých podnětů.

TRPV1 iontový kanál je exprimován v nociceptivních C a A $\delta$  nervových vláknech, kde slouží jako receptor pro nejrůznější bolestivé stimuly. Lze jej aktivovat zvýšením

teploty prostředí ( $> 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) či snížením pH tekutiny v extracelulárním prostoru. Mezi endogenní agonisty TRPV1 receptoru se řadí produkty lipoxygenáz, které hrají důležitou úlohu při vzniku zánětlivé bolesti, či endokanabinoidy anandamid a N-arachydonoyl-dopamin (Zygmunt et al., 1999; Hwang et al., 2000; Huang et al., 2002). Je známa řada přírodních dráždivých a toxických látek, jejichž účinek je zprostředkován přímou aktivací TRPV1 iontového kanálu – vaniloidy kapsaicin a reziniferatoxin, jež jsou produkovány pálivými paprikami a pryšci druhu *Euphorbia resinifera*, alicin z česneku a cibule či některé komponenty pavoučích jedů (Macpherson et al., 2005; Siemens et al., 2006; Bohlen et al., 2010). TRPV1 receptor dále reaguje na depolarizaci membrány, i když jeho citlivost na napětí je mnohem nižší než u klasických napětově ovládaných iontových kanálů.

Činnost TRPV1 receptoru je modulována fosforylací různými proteinkinázami i lipidickým složením membrán. Zánětlivé mediátory, jako jsou bradykinin, serotonin, prostaglandiny či adenosintrifosfát (ATP) tak mohou skrze intracelulární signalizační dráhy snižovat aktivační práh TRPV1 iontového kanálu, což je jeden z mechanismů vzniku zánětlivé hyperalgie (Planells-Cases et al., 2005; Touska et al., 2011). Také míra exprese TRPV1 na povrchu buňky je mediátory zánětu regulována (Zhang et al., 2008). Úloha TRPV1 iontového kanálu v rozvoji zánětlivých, ale i neuropatických stavů bolesti byla prokázána pokusy na myších, u kterých byl *Trpv1* gen vyřazen, či byla potlačena jeho exprese (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Christoph et al., 2007; Wu et al., 2013).

## **1.2.2 Farmakologie TRPV1 receptoru**

### **1.2.2.1 Analgetické působení agonistů TRPV1 receptoru**

Specifická exprese TRPV1 receptoru v nociceptivních nervových vláknech a jeho význam při vzniku bolestivých stavů činí tento iontový kanál důležitým cílem léčiv proti bolesti. V nedávné době byla provedena řada klinických testů zaměřených na hodnocení analgetických účinků agonistů i antagonistů TRPV1 receptoru. Vliv agonistů TRPV1 na analgezií je připisován jejich schopnosti desenzitizovat iontový kanál a také skrze depolarizaci blokovat funkci nociceptivních nervových zakončení bez ovlivnění ostatních sensorických vláken (Anand and Bley, 2011). Kapsaicin je již řadu let užíván ve formě mastí a náplastí pro léčbu neuropatické a muskuloskeletální bolesti. Analgetické účinky

této látky podávané pravidelně v nízkých koncentracích však nejsou příliš významné (Mason et al., 2004; Derry and Moore, 2012). V nedávné době byla do klinické praxe uvedena náplast obsahující vysokou koncentraci kapsaicinu (8 %). Tato náplast je pacientům aplikována lékařem většinou za současného použití lokálních anestetik pro omezení počáteční pálivé bolesti. Analgezie vyvolaná silnou dávkou kapsaicinu je dlouhotrvající a projevuje se u většího počtu pacientů v porovnání s opakovanou aplikací nízké dávky (Derry et al., 2013).

Pro zmírnění bolesti by agonisté TRPV1 receptoru mohli být využíváni také nepřímým způsobem – mohli by umožnit zacílení neselektivních anestetik, jež potlačují vznik akčních potenciálů u všech senzoričkových, motorických i autonomních nervových vláken, specificky do nociceptorů. Lokální anestetika inhibují napět'ově ovládané sodíkové kanály ( $\text{Na}_v$ ) vazbou do pórové oblasti z cytoplazmatické strany membrány (Ragsdale et al., 1996). Pokud jsou tyto látky chemicky upraveny tak, že samovolně neprostupují membránou, jsou schopny blokovat  $\text{Na}_v$  kanály pouze při aplikaci z intracelulární strany (Frazier et al., 1970). Bylo ukázáno, že pro vstup nabitě formy lidokainu QX-314 do cytozolu nociceptivních nervových vláken může posloužit právě TRPV1 iontový kanál, jehož pór je v otevřeném stavu propustný i pro větší molekuly. Při použití kombinace agonisty TRPV1 receptoru a hydrofilního lokálního anestetika pak lze dosáhnout utlumení činnosti nociceptorů bez zasažení funkce ostatních nervových vláken (Binshtok et al., 2007).

### **1.2.2.2 Analgetické působení antagonistů TRPV1 receptoru**

Z preklinických studií vyplývá, že by antagonisté TRPV1 receptoru mohli být používáni jako analgetika u pacientů s chronickou bolestí (Brandt et al., 2012). Klinické testování však bylo u většiny antagonistů pozastaveno, neboť jejich aplikace vedla k nežádoucímu zvýšení tělesné teploty (Gavva et al., 2007; Wong and Gavva, 2009). Hypertermie vyvolaná antagonisty je pravděpodobně důsledkem inhibice tonicky aktivních TRPV1 receptorů exprimovaných v nervových vláknech, která inervují vnitřní orgány těla (Steiner et al., 2007). Fyziologický význam TRPV1 receptorů v termoregulaci, ani stimulační signál udržující tonickou aktivitu iontových kanálů nejsou známy. Předpokládá se, že by TRPV1 receptory mohly sloužit jako převodníky signálu mezi gastrointestinálním traktem (GIT) a termoregulačními orgány. TRPV1 receptory by

například mohly zprostředkovávat pokles tělesné teploty při dlouhodobém hladovění v reakci na pokles pH v lumen GIT (Kanizsai et al., 2009; Romanovsky et al., 2009).

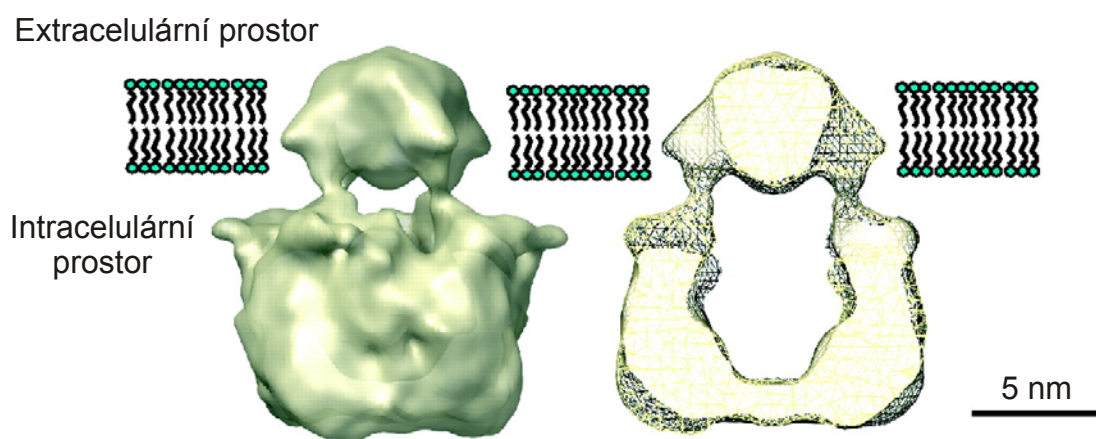
Vývoj antagonistů TRPV1 receptoru druhé generace je zaměřen na cílené vyhledávání látek, které působí rozdílně na odlišné módy aktivace TRPV1 receptoru. Bylo zjištěno, že látky, které blokují aktivaci vyvolanou kapsaicinem či endogenními lipidy, zároveň však nejsou schopny plně inhibovat protony vyvolané odpovědi TRPV1 iontového kanálu, nezpůsobují hypertermii u potkanů. I přes selektivní působení vzhledem k jednotlivým modalitám tyto látky vykazují analgetické účinky u různých zvířecích modelů zánětlivé a neuropatické bolesti (Lehto et al., 2008; Watabiki et al., 2011; Reilly et al., 2012). Skutečnost, že zachování odpovědi receptoru při stimulaci sníženým pH je důležité pro udržení normotermie, poukazuje na úlohu protonů jako endogenních aktivátorů viscerálních tonicky aktivních TRPV1 iontových kanálů. Další klinické testy prokáží, zda TRPV1 antagonisté druhé generace budou mít význam při léčbě patologických bolestivých stavů u lidí.

Objev antagonistů působících odlišně na různé módy aktivace TRPV1 receptoru potvrzuje hypotézu, že jednotlivé aktivační stimuly vyvolávají odlišné konformační změny, všechny však vedou ke zvýšení pravděpodobnosti otevření iontového kanálu. Z tohoto důvodu se při použití různých stimulačních látek může účinek inhibitorů lišit. Rozmanitost konformačních změn je důsledkem přítomnosti odlišných vazebných domén pro jednotlivé agonisty. Následující kapitoly budou věnovány strukturnímu uspořádání TRPV1 receptoru a významu jednotlivých stavebních modulů v aktivaci různými typy agonistů.

### **1.2.3 Strukturní charakteristiky TRPV1 proteinového komplexu**

Analýzou sekvencí TRP receptorů a funkčními studii bylo zjištěno, že je jejich sekundární i terciární struktura vzdáleně příbuzná již známým napětově ovládaným kanálům. Každá podjednotka TRP receptorů obsahuje šest transmembránových segmentů (S1 – S6) a aminový i karboxylový konec směřují do cytozolu. Předpokládá se, že se jednotlivé podjednotky skládají do homo- či hetero-tetramerních komplexů. Zobrazení přesné prostorové struktury proteinů s vysokým rozlišením lze získat metodou rentgenové krystalografie, doposud se však nepodařilo žádný z TRP receptorů krystalizovat v plné délce. Jsou známy pouze rentgenové struktury některých intracelulárních oblastí N- a C-konce.

Prostorová rekonstrukce celého TRPV1 receptoru byla vytvořena pomocí metody jednočásticové elektronové mikroskopie (Obrázek 1.1) (Moiseenkova-Bell et al., 2008). Rozlišení takto získané proteinové struktury je nízké (19 Å) a umožňuje pouze hrubou charakterizaci prostorové stavby iontového kanálu. Rekonstrukce TRPV1 proteinového komplexu potvrdila tetramerní uspořádání. Menší transmembránová doména TRPV1 receptoru je propojena pomocí tenkých spojů s velkou intracelulární doménou, která je tvořená N- i C-koncem každé ze čtyř podjednotek.

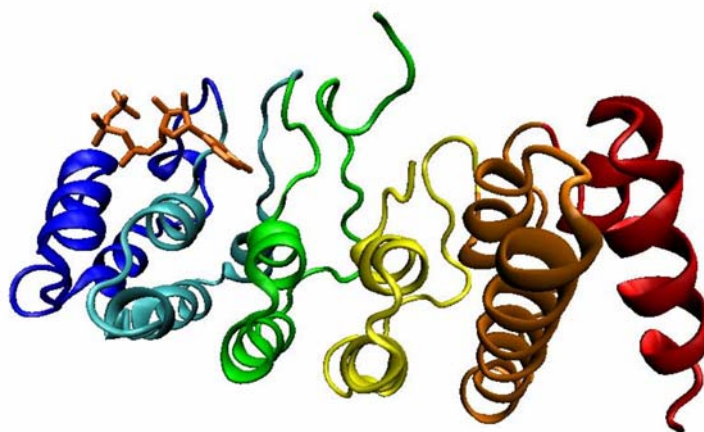


**Obrázek 1.1** Prostorová rekonstrukce TRPV1 receptoru v rozlišení 19 Å získaná metodou jednočásticové elektronové mikroskopie. TRPV1 iontový kanál je složen ze dvou domén – transmembránové a intracelulární – které jsou propojeny tenkými spoji. Intracelulární doména, složená z N- a C-konce každé ze čtyř podjednotek, obklopuje centrální dutinu. Převzato z (Moiseenkova-Bell et al., 2008).

### 1.2.3.1 Cytosolická N-koncová doména

N-konec TRPV1 receptoru obsahuje ankyrinovou doménu složenou z šesti párů antiparalelních helixů, každý propojený se sousedním párem proteinovou smyčkou (Obrázek 1.2) (Lishko et al., 2007). U řady bílkovin zajišťují ankyrinové domény důležité protein-proteinové interakce. Ankyrinová oblast TRPV1 receptoru obsahuje vazebné místo pro ATP a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin - důležité regulační molekuly, které modulují činnost TRPV1 receptoru. ATP působící z intracelulární strany membrány má senzitivizační účinky na aktivitu TRPV1 iontového kanálu a omezuje míru desenzitizace při opakované stimulaci agonistou (Kwak et al., 2000; Lishko et al., 2007). Naopak vazba kalmodulinu v komplexu s vápenatými ionty vede ke snížení aktivity iontového kanálu, což je jeden z pravděpodobných mechanismů, kterým je činnost TRPV1 receptoru zpětnovazebně modulována. Při opakované stimulaci agonistou za podmínek, kdy jsou v extracelulárním

prostředí přítomny vápenaté ionty, dochází k desenzitizaci – snižování velikosti odpovědi TRPV1 kanálu (Koplas et al., 1997). Předpokládá se, že vápenaté ionty, které vstupují skrz otevřený TRPV1 iontový kanál do buňky, se váží na kalmodulin, čímž umožní jeho interakci s ankyrinovou doménou N-konce. Neboť ATP a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin soutěží o stejné vazebné místo, senzitivizační účinky ATP jsou tímto potlačeny (Rosenbaum et al., 2004; Lishko et al., 2007).



**Obrázek 1.2** Struktura N-koncové ankyrinové domény TRPV1 receptoru s navázaným ATP určena pomocí metody rentgenové krystalografie. Ankyrinová doména se skládá ze šesti párů antiparalelních helixů propojených smyčkou. Oblast prvních tří párů helixů obsahuje vazebné místo pro ATP (oranžově). (Lishko et al., 2007)

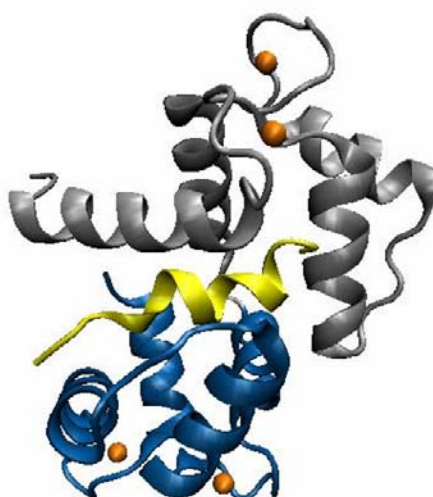
### 1.2.3.2 Cytosolická C-koncová doména

C-koncová doména zajišťuje tetramerizaci TRPV1 proteinového komplexu a významným způsobem moduluje aktivitu iontového kanálu (Garcia-Sanz et al., 2004; Zhang et al., 2011). V těsné blízkosti S6 transmembránové domény se nalézá takzvaný „TRP box“ – sekvence šesti vysoce konzervovaných aminokyselin (EWK FAR) charakteristická pro řadu TRP receptorů, jejichž mutace vede k silnému postižení vrátkovacích vlastností TRPV1 iontového kanálu (Valente et al., 2008).

Cytosolická C-koncová doména se pravděpodobně váže na intracelulární list membrány skrze interakci s polární hlavičkou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu ( $\text{PIP}_2$ ). Byla nalezena dvě vazebná místa pro  $\text{PIP}_2$  – první v proximální části ihned za TRP boxem a druhé v distální části C-konce TRPV1 receptoru (Ufret-Vincenty et al., 2011; Grycova et al., 2012; Cao et al., 2013).  $\text{PIP}_2$  je důležitým regulačním faktorem, který

ovlivňuje činnost TRPV1 receptoru. Různé výzkumné skupiny však mají protichůdné názory na to, zda interakce s PIP<sub>2</sub> posiluje či potlačuje aktivitu iontového kanálu (Prescott and Julius, 2003; Brauchi et al., 2007; Klein et al., 2008; Yao and Qin, 2009). Je pravděpodobné, že charakter regulace souvisí s mírou aktivity TRPV1 kanálu (Rohacs et al., 2008).

V distální části C-koncové domény se dále nalézá druhé vazebné místo TRPV1 receptoru pro Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin, jehož rentgenovou strukturu se podařilo v nedávné době stanovit. N- i C-koncová doména kalmodulinu v komplexu s vápenatými ionty interaguje s krátkou  $\alpha$ -helikální strukturou blízko karboxylového konce TRPV1 proteinu (Obrázek 1.3) (Lau et al., 2012). Úloha této oblasti v regulaci aktivity iontového kanálu není dosud plně objasněna.



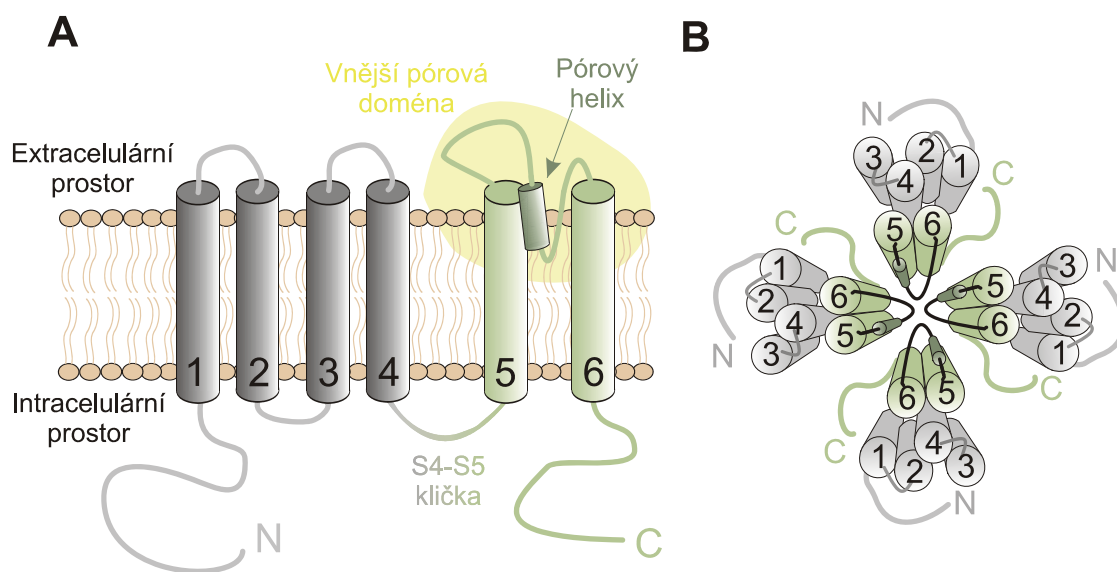
**Obrázek 1.3** Rentgenová struktura Ca<sup>2+</sup>-kalmodulinu ve vazbě na distální část C-koncové domény TRPV1 receptoru. C- a N-koncová doména kalmodulinu jsou zobrazeny v šedé a modré barvě. Žlutě je znázorněn  $\alpha$ -helix C-konce TRPV1 receptoru. Oranžové koule představují vápenaté ionty (Lau et al., 2012).

### 1.2.3.3 Transmembránová doména

Přítomnost šesti transmembránových (TM) segmentů v rámci jedné podjednotky je charakteristická nejen pro TRP receptory, ale také pro napětově ovládané draslíkové a sodíkové kanály. Pátý a šestý TM úsek každé podjednotky spolu s kličkou, která je spojuje (S5–S6 oblast), vytvářejí dohromady centrálně uloženou pórovou doménu, jež zajišťuje vodivé propojení mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem (Owsianik et al., 2006). Konformační změny v rámci této domény jsou podkladem vrátkování



iontových kanálů. Pórovou doménu obklopují čtyři periferní domény tvořené S1 – S4 segmenty (Obrázek 1.4). U napětově ovládaných iontových kanálů se periferní oblast nazývá doménou napětového senzoru, neboť je schopna detekovat změny napětí na membráně. Pórová doména i doména napětového senzoru existují u jiných vzdáleně příbuzných proteinů i jako samostatné funkční domény. Dovnitř usměřňující draslíkové kanály ( $K_{ir}$ ) obsahují pouze pórovou doménu a cytozolické N- a C-konce (Hibino et al., 2010). Naopak napětově ovládané protonové kanály ( $H_v$ ) jsou složeny ze dvou domén napětového senzoru, přičemž každá umožňuje průchod protonů skrz membránu (DeCoursey, 2013). Mechanismus vrátkování u tohoto typu iontových kanálů doposud nebyl vysvětlen. Úloha napětového senzoru jako samostatného funkčního modulu byla potvrzena i nedávným objevem napětově citlivé fosfatázy sumek, u které je tento transmembránový modul napojen na cytozolickou katalytickou doménu fosfatázy a umožňuje regulaci aktivity enzymu v závislosti na membránovém potenciálu (Murata et al., 2005; Murata and Okamura, 2007).



**Obrázek 1.4** Struktura transmembránové oblasti TRPV1 receptoru. (A) Struktura jedné podjednotky TRPV1 receptoru. (B) Schematické znázornění prostorového uspořádání transmembránových domén tetrameru TRPV1 receptoru při pohledu z extracelulární strany membrány. Podobně jako u  $K_v$  iontových kanálů má každá podjednotka šest transmembránových segmentů (S1 – S6). S5 a S6 spolu s kličkou, která je spojuje, obklopují centrální pór (zeleně). S1 – S4 tvoří takzvanou doménu napětového senzoru, která je uložena periferně (šedě).

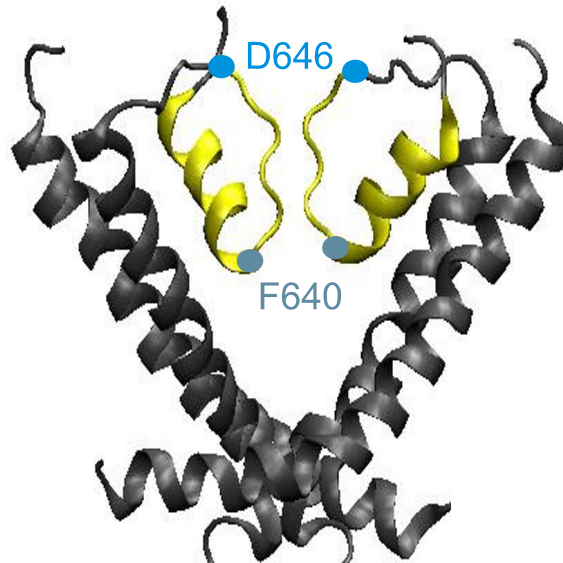
Dle analogie s  $K_v$  kanály se předpokládá, že vrátka TRPV1 iontového kanálu jsou tvořena S6 transmembránovými segmenty, které na sebe v klidovém stavu těsně naléhají a brání prostupu iontů. Konformační změny spojené s aktivací pravděpodobně vedou ke vzájemnému oddálení S6 (případně jejich částí), čímž se vytvoří skulina, kterou

mohou ionty ale i větší molekuly procházet. U TRPV1 receptoru byla vskutku objevena dvě zúžení póru tvořená intracelulárním koncem S6 segmentů. První brání prostupu iontů a druhé znemožňuje průchod větších molekul (Salazar et al., 2009). Vědci zabývající se studiem strukturně-funkčních vlastností TRPV1 receptoru se domnívají, že různé aktivační podněty mohou vést k rozdílným konformačním změnám TRPV1 receptoru, jež však všechny zvyšují pravděpodobnost otevření těchto společných vrátek.

Oblast vnějšího póru je tvořena extracelulární částí pátého a šestého transmembránového segmentu a kličkou, která je spojuje (Obrázek 1.4). Blízko C-konce pórové kličky TRPV1 receptoru je umístěn selektivní filtr, jehož sekvence je velmi příbuzná sekvenci selektivního filtru draslíkových kanálů (TIGMG u TRPV1 a TVGYG u draslíkových kanálů). Přesto je však TRPV1, podobně jako většina ostatních TRP receptorů, neselektivním iontovým kanálem, který propouští jak monovalentní, tak divalentní kationty. V ústí selektivního filtru se nalézá negativně nabitý aminokyselinový zbytek (D646), jenž umožňuje vysokoafinitní vazbu kationtů do oblasti póru a usnadňuje vstup vápenatých iontů do buňky (Obrázek 1.5). Neutralizace tohoto rezidua nejen snižuje relativní propustnost pro ionty vápníku, ale postihuje i citlivost TRPV1 receptoru k rutheniové červeni – kladně nabitě sloučenině, která je známým nespecifickým blokátorem TRP receptorů (Garcia-Martinez et al., 2000).

Extracelulární část pórové domény není rigidní strukturou, jak se původně předpokládalo. U  $K_v$  kanálů jsou konformační změny této oblasti podkladem pomalého typu inaktivace. Při dlouhodobé stimulaci dochází u těchto iontových kanálů k destabilizaci selektivního filtru a následnému snížení propustnosti pro draselné ionty (Leung, 2012). Naopak, u TRPV1 receptorů se s dobou aktivace relativní propustnost pro objemnější kationty zvyšuje, což může být důsledkem dynamických změn struktury vnějšího póru (Chung et al., 2008).

Oblast vnějšího póru se také podílí na vrátkování TRPV1 receptoru. Byla popsána dvě rezidua umístěná na rozmezí selektivního filtru a navazujícího pórového helixu (F640 a T641) (Obrázek 1.5), jejichž mutace vedla k výraznému zvýšení pravděpodobnosti otevření iontového kanálu i za podmínek, kdy TRPV1 receptor nebyl vystaven žádnému stimulačnímu podnětu (Myers et al., 2008).



**Obrázek 1.5 Struktura pórové oblasti TRPV1 receptoru.** Homologní model pórové domény TRPV1 receptoru vytvořený na základě známé krystalové struktury  $K_v1.2$  iontového kanálu (Brauchi et al., 2007). S5 a S6 segmenty jsou znázorněny v šedé barvě, pórový helix spolu se selektivním filtrem ve žluté barvě. Dlouhá klička mezi S5 a pórovým helixem pro přehlednost není zobrazena. Aspartát na pozici 646 umožňuje vysokoafinitní vazbu kationtů do oblasti póru a usnadňuje vstup vápenatých iontů do buňky (Garcia-Martinez et al., 2000). Záměna fenylalaninu na pozici 640 za leucin vede ke vzniku spontánně aktivních TRPV1 receptorů (Myers et al., 2008).

## 1.2.4 Mechanismus účinku agonistů TRPV1 receptoru

### 1.2.4.1 Napěťový senzor

Mechanismus aktivace vyvolané depolarizací je u napěťově ovládaných draslíkových kanálů poměrně dobře popsán, především díky známé krystalové struktuře některých zástupců této skupiny receptorů. S4 segment obsahuje několik kladně nabitých aminokyselinových zbytků, které umožňují jeho pohyb v rámci domény napěťového senzoru při změně membránového potenciálu. Konformační změny napěťového senzoru navozené depolarizací jsou prostřednictvím kličky mezi S4 a S5 přenášeny na pórovou doménu, čímž je umožněno otevření vrátek iontového kanálu (Stock et al., 2013). Pro správné vrátkování draslíkových kanálů je důležité i druhé kontaktní místo mezi doménou napěťového senzoru a pórovou oblastí tvořené extracelulární částí S1 a pórovým helixem sousední podjednotky. Tato styčná plocha obou domén umístěná na opačné straně membrány než S4–S5 klička pravděpodobně tvoří důležitý opěrný bod potřebný pro účinnou transdukcí signálu od S4 segmentu na vrátka  $K_v$  kanálů (Lee et al., 2009).

V S4 segmentu TRPV1 receptoru, jehož napěťová závislost je mnohem slabší než u  $K_v$  kanálů, se vyskytuje pouze jedno kladně nabitě reziduum – arginin na pozici 557. Ve svém předchozím rozsáhlém projektu jsem se zabývala úlohou R557 a dalších konzervovaných aminokyselinových zbytků S4/S4–S5 oblasti TRPV1 iontového kanálu v citlivosti k napětí (Boukalova et al., 2010). U mutantních receptorů se záměnou R557 za nenabitě reziduum alanin či leucin jsme pozorovali nejen výrazné postižení napěťové závislosti, ale i snížení citlivosti k chemickým a tepelným podnětům. Konzervativní záměna argininu 557 za jinou kladně nabitou aminokyselinu lysin se naopak projevila zvýšením aktivity TRPV1 receptoru, zároveň však byla kinetika odpovědi R557K konstruktů na kapsaicin výrazně zpomalena. Z našich výsledků je zřejmé, že arginin v S4 segmentu má důležitý význam nejen v napěťové citlivosti, ale také ve vrátkování TRPV1 receptoru při chemické či tepelné stimulaci.

Elektrofyzilogickými pokusy jsme prokázali, že pro funkční vlastnosti TRPV1 iontového kanálu je klíčová elektrostatická interakce mezi R557 a glutamátovým aminokyselinovým zbytkem v S4–S5 kličce (E570). Narušení této interakce a z toho vyplývající strukturní postižení S4–S5 kličky je pravděpodobným podkladem chybného vrátkovacího mechanismu receptorů s mutovaným R557 aminokyselinovým zbytkem. Předpoklad, že klička mezi čtvrtým a pátým transmembránovým segmentem má důležitý funkční význam ve vrátkování TRPV1 receptoru, je podpořen také skutečností, že záměna glycinu v dané oblasti za serin (G563S mutace) vedla ke vzniku spontánně aktivních TRPV1 iontových kanálů (Boukalova et al., 2010).

#### **1.2.4.2 Vazebná místa agonistů**

Citlivost k vaniloidním látkám se liší u různých živočišných druhů. Například králíčí TRPV1 receptory jsou mnohem méně citlivé na kapsaicin než potkaní či lidské podtypy, ptačí TRPV1 receptory dokonce nelze aktivovat ani vysokou koncentrací kapsaicinu. Rozdílných funkčních vlastností různých podtypů TRPV1 receptoru bylo využito při hledání vazebného místa pro vaniloidy. Chimérní králíčí či ptačí TRPV1 iontové kanály, u kterých byla část proteinové sekvence mezi S2 a S4 transmembránovým segmentem zaměněna za homologní sekvenci potkaního podtypu, vykazovaly proudové odpovědi při stimulaci kapsaicinem, jejichž velikost byla srovnatelná s amplitudou odpovědi potkaní formy TRPV1. Obdobně lze přenést citlivost ke kapsaicinu i na TRPV2 a TRPV3 receptory, jejichž přirozené formy nejsou vaniloidy

stimulovány. Pokusy na TRPV1 receptorech s bodovými záměnami následně potvrdily přítomnost vazebného místa pro vaniloidní aktivátory v hydrofobní kapse mezi S3 a S4 (Jordt and Julius, 2002; Gavva et al., 2004; Johnson et al., 2006). Do stejné oblasti se váží i endogenní agonisté anandamid a N-arachydonoyl-dopamin, jejichž struktura je příbuzná vaniloidním látkám (Jordt and Julius, 2002; Gavva et al., 2004; Sutton et al., 2005).

Alicin, dráždivá komponenta česneku, je vysoce reaktivní látkou, která kovalentně modifikuje thiolové skupiny proteinů (Kyung, 2012). Bylo zjištěno, že alicin aktivuje TRPV1 receptor skrze interakci s cysteinovým zbytkem na cytozolickém N-konci. Mechanismus účinku této látky je tudíž odlišný od jiných agonistů TRPV1 iontového kanálu (Salazar et al., 2008).

### 1.2.4.3 Teplotní senzor

Aktivita TRPV1 receptoru prudce stoupá při teplotě prostředí vyšší než 42 °C. Řada výzkumných skupin se zaměřila na hledání specifické struktury TRPV1 receptoru, která zodpovídá za teplotní citlivost. Tento přístup však může být zavádějící, neboť oproti senzoru chemických agonistů, nemusí být teplotní senzor lokalizován v jedné funkční doméně. Otevření iontového kanálu při stimulaci zvýšenou teplotou může být důsledkem malých konformačních změn v nejrůznějších částech TRPV1 receptoru (Clapham and Miller, 2011). Doposud byly popsány tři funkční domény, které specificky zodpovídají za citlivost TRPV1 iontového kanálu k tepelným podnětům – cytozolický N- i C-konec a vnější pórová doména.

Delece distální části C-koncové domény vede ke snížení teplotního prahu pro aktivaci TRPV1 receptoru (Vlachova et al., 2003). Navíc chimérický TRPV1 iontový kanál, který obsahuje C-konec chladem aktivovaného TRPM8 receptoru, je specificky aktivován snížením teploty prostředí. Analogický fenotypový zvrát lze pozorovat u TRPM8 receptoru s C-koncem TRPV1 – aktivita tohoto konstruktů stoupá se zvyšováním teploty (Brauchi et al., 2006). Obdobné chimérické pokusy, v rámci kterých byly zaměňovány jednotlivé domény teplotně aktivovaných TRPV receptorů, odhalily významnou úlohu části N-koncové oblasti, která spojuje ankyrinovou doménu s S1 segmentem, v citlivosti TRPV1 iontového kanálu k tepelným podnětům (Yao et al., 2011).

V nedávné době byly popsány bodové mutace či rozsáhlejší delece ve dvou extracelulárních kličkách spojujících S5 a S6 segmenty s pórovým helixem a selektivním

filtrem, jež vedou ke specifickému poškození teplotní závislosti TRPV1 receptoru při zachování odpovědi vyvolaných chemickou či napěťovou stimulací (Grandl et al., 2010; Cui et al., 2012). Fluorescenčními pokusy byla navíc zaznamenána konformační změna v rámci této vnější pórové oblasti spojená s aktivací TRPV1 iontového kanálu zvýšenou teplotou. Při stimulaci kapsaicinem či depolarizačním napětím však zmíněná konformační změna pozorována nebyla (Yang et al., 2010). Je tedy zřejmé, že pohyby vnějšího póru jsou podmíněny změnou teploty prostředí (Kim et al., 2013). Otázkou však zůstává, jestli tato oblast tvoří vlastní teplotní senzor či se pouze podílí na transdukcii tepelného signálu na vrátka TRPV1 iontového kanálu.

#### **1.2.4.4 Vazebná místa protonů**

Protony jsou fyziologicky významnými agonisty TRPV1 receptoru. K otevření iontových kanálů dochází při silném poklesu pH prostředí ( $< 6$ ). Mírné okyselení extracelulárního roztoku, které není schopno aktivovat TRPV1 receptor samostatně, vede k potenciaci odpovědi na kapsaicin i tepelné podněty a zároveň snižuje aktivační práh pro dané stimuly (Tominaga et al., 1998). Při analýze aktivity jednotlivých TRPV1 iontových kanálů bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace protonů výrazně zvyšuje pravděpodobnost otevření, zároveň však snižuje vodivost (Baumann and Martenson, 2000). Při měření sumárních proudů z celé buňky není možné pokles vodivosti zaznamenat, neboť je amplituda odpovědi protony současně zvyšována.

Mechanismus účinku sníženého pH je zprostředkován elektrostatickou interakcí protonů s několika záporně nabitými aminokyselinovými zbytky S5–S6 kličky, jež je vystavena extracelulárnímu prostředí (Obrázek 1.6). Pokles vodivosti je důsledkem konformační změny pórové oblasti vyvolané vazbou protonů na glutamát 636 umístěný v pórovém helixu a aspartát 646 v ústí selektivního filtru (Liu et al., 2009). Protonace glutamátů na pozicích 600 a 648 naopak vede ke zvýšení aktivity TRPV1 receptoru (Jordt et al., 2000). Neutralizace těchto reziduí mimikuje protonovaný stav iontového kanálu, čehož se využívá pro stanovení funkčního významu jednotlivých aminokyselinových zbytků.

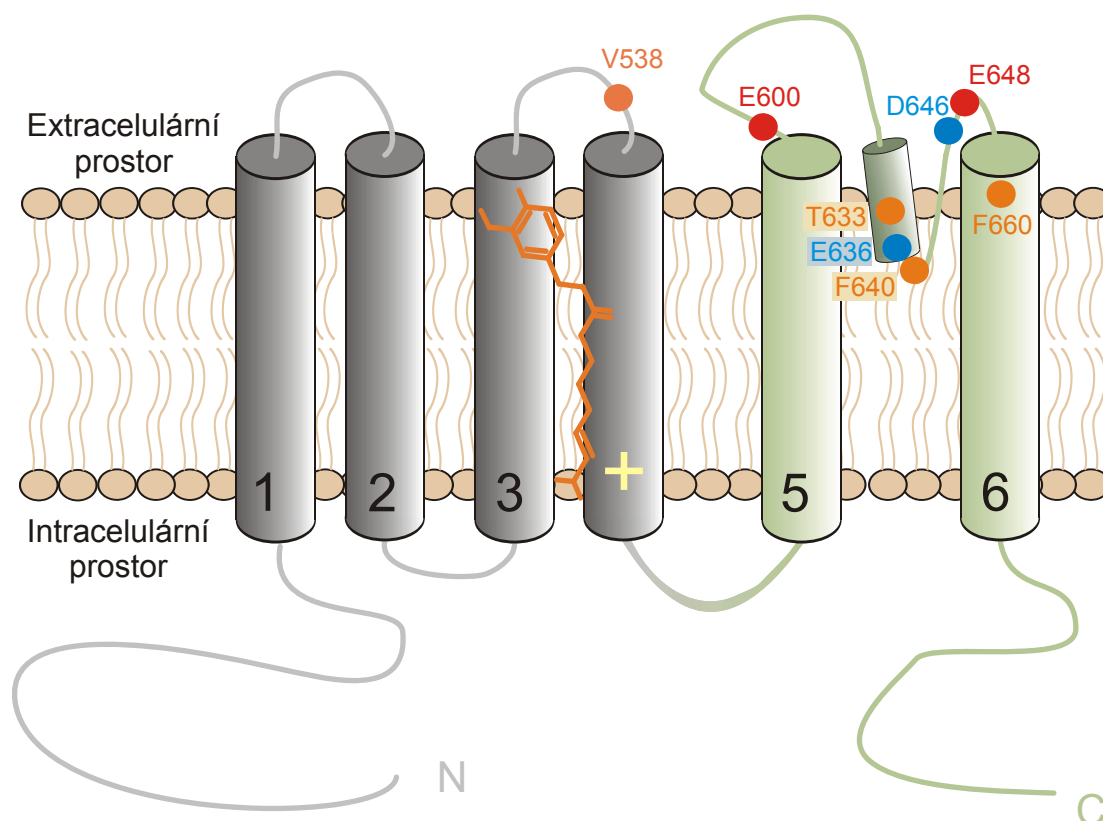
Citlivost E600Q konstruktů ke kapsaicinu i tepelným podnětům je výrazně posílena, což se projevilo i na zhoršené životaschopnosti buněk, jež tento mutantní iontový kanál exprimují. Při opakované stimulaci navíc dochází ke zvyšování bazálního proudu těchto buněk. Přestože je možné TRPV1 receptory s neutralizovaným E600

zbytkem aktivovat aplikací roztoku se silně sníženým pH, protony nejsou schopny potencovat odpovědi vyvolané kapsaicinem či zvýšením teploty prostředí. Fenotypové vlastnosti E600Q konstruktů tedy připomínají TRPV1 iontový kanál pracující v podmínkách sníženého pH. Zbytková citlivost k aktivačním účinkům protonů je pravděpodobně zprostředkována vazbou vodíkových iontů na další negativně nabitě zbytky TRPV1 receptoru, především glutamát na pozici 648 (Jordt et al., 2000).

Fenotypové vlastnosti spontánně aktivních TRPV1 receptorů s F640L mutací na rozhraní pórového helixu a selektivního filtru se podobají vlastnostem E600Q konstruktů. Autoři práce Myers et al. (2008) se tudíž domnívají, že záměna F640L vede k takové změně konformace pórové oblasti, jež mimikuje protony vybuzený stav TRPV1 iontového kanálu. Tím je také vysvětlena zvýšená klidová aktivita F640L konstruktů.

Důležitost vnější pórové domény při transdukcii aktivačního signálu vazby protonů na vrátka TRPV1 receptoru byla potvrzena objevem dvou aminokyselinových zbytků v dané oblasti, jejichž mutace specificky poškozují citlivost ke stimulačním účinkům sníženého pH. Konstrukty se záměnou T633A v pórovém helixu a F660S v extracelulární části S6 segmentu není možné aktivovat ani silným okyselením prostředí, zároveň jsou však jejich odpovědi vyvolané kapsaicinem a tepelnými podněty plně zachovány (Ryu et al., 2007; Aneiros et al., 2011). U F660S konstruktů dokonce nebyly pozorovány ani potenciační účinky sníženého pH, naopak, zvýšená koncentrace protonů v extracelulárním prostoru vedla ke snížení amplitudy kapsaicinové odpovědi buněk (Aneiros et al., 2011). Pozorované inhibiční působení protonů může odrážet snížení vodivosti TRPV1 iontového kanálu, jež je u přirozené formy TRPV1 receptoru maskováno aktivačními účinky vodíkových iontů.

Konformační změny TRPV1 iontového kanálu vyvolané zvýšenou koncentrací protonů v extracelulárním prostoru se pravděpodobně neomezují pouze na pórovou oblast. Mutace jedné aminokyseliny v extracelulární S3–S4 kličce periferní domény (V538L mutace) se podobně jako záměny v pórové doméně projevila poškozením citlivosti ke sníženému pH při zachování standardních odpovědí vyvolaných aplikací kapsaicinu či zvýšenou teplotou prostředí (Ryu et al., 2007). Záměna valinu za leucin většinou nevede k významnému narušení struktury proteinů. Je tudíž zřejmé, že přesná konformace periferní domény je zásadní pro správný přenos signálu od glutamátových zbytků vnější pórové oblasti, jež slouží jako pH senzory, na vrátka TRPV1 iontového kanálu.



**Obrázek 1.6 Umístění aminokyselinových zbytků důležitých pro citlivost TRPV1 receptoru k protonům.** Modře jsou zobrazena rezidua, jejichž interakce s protony vede ke snížení vodivosti iontového kanálu. Aktivační účinky sníženého pH jsou zprostředkovány vazbou protonů na červeně označené aminokyselinové zbytky. Oranžově jsou vyznačena rezidua, jejichž mutace vede k postižení transdukce aktivačního signálu na vrátka TRPV1 receptoru. Schematicky je znázorněno i vazebné místo pro kapsaicin a umístění kladně nabitého argininu důležitého pro napěťovou závislost TRPV1 iontového kanálu.

### 1.3 TRPV3 receptor

TRPV3 receptor je dalším zástupcem skupiny vaniloidních TRP receptorů, jehož aktivita je silně závislá na teplotě okolního prostředí. S TRPV1 receptorem, jehož primární sekvence se shoduje se sekvencí TRPV3 iontového kanálu ze 43 %, sdílí strukturální a některé funkční charakteristiky. TRPV3 receptor je stimulován již za fyziologických teplot (> 33 °C) a jeho aktivita stoupá se vzrůstající teplotou prostředí (Peier et al., 2002; Smith et al., 2002). Mezi agonisty TRPV3 receptoru se řadí některé přírodní látky, které při konzumaci navozují pocit tepla a při kontaktu s pokožkou mohou působit jako alergeny. Známé aktivátory TRPV3 iontového kanálu, jako jsou karvakrol, eugenol, thymol a kafr, tvoří aktivní komponentu rostlin užívaných jako koření – dobromysli, hřebíčku, tymiánu a rozmarýnu (Moqrich et al., 2005; Xu et al., 2006). 2-aminoetoxydifenyborát (2-APB), syntetická látka, která inhibuje IP<sub>3</sub> receptory a některé TRP iontové kanály, je společným aktivátorem TRPV1, TRPV2 a TRPV3



receptorů (Hu et al., 2004; Chung et al., 2004). Jediným doposud známým endogenním agonistou TRPV3 iontového kanálu je farnesylypyrofosfát, jeden z meziproductů syntetické dráhy cholesterolu (Bang et al., 2010). Podobně jako TRPV1 receptor je činnost TRPV3 regulována také některými intracelulárními signalizačními dráhami (Hu et al., 2006; Doerner et al., 2011).

### **1.3.1 Fyziologická funkce TRPV3 receptorů**

#### **1.3.1.1 Úloha TRPV3 receptoru jako teplotního senzoru organismů**

V roce 2005 vyšla práce zabývající se charakterizací fenotypu myši s vyřazeným *Trpv3* genem (*Trpv3* KO) (Moqrich et al., 2005). Behaviorální testy prokázaly, že zvířata bez TRPV3 receptoru mají postižené vnímání tepelných podnětů. TRPV3 iontové kanály tudíž pravděpodobně slouží jako transdukční molekuly sensorického nervového systému. U hlodavců jsou však TRPV3 receptory exprimovány především v kožních buňkách – keratinocytech a buňkách obklopujících vlasový folikul. V neuronech zadních kořenů míšních jejich přítomnost pozorována nebyla. Vystává otázka, jakým způsobem jsou sensorické neurony aktivovány při stimulaci TRPV3 receptoru mimo nervový systém (Peier et al., 2002).

Jednou z pravděpodobných možností je, že aktivace TRPV3 iontových kanálů vede k uvolnění signálních molekul z keratinocytů, jež mohou aktivovat přilehlá nervová zakončení v kůži. Signálními molekulami, které by mohly zprostředkovávat přenos informace z kožních buněk na nervová vlákna, jsou ATP, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) a oxid dusnatý (NO). Všechny zmíněné molekuly jsou uvolňovány keratinocyty při tepelné stimulaci. Navíc je jejich výlev závislý na přítomnosti TRPV3 iontových kanálů. V pokusech, kdy byly keratinocyty a neurony zadních kořenů míšních pěstovány ve společné kultuře, bylo prokázáno, že ATP uvolněné z keratinocytů při zvýšení teploty prostředí aktivuje blízká nervová zakončení (Huang et al., 2008; Mandadi et al., 2009; Miyamoto et al., 2011).

Úloha TRPV3 receptoru jako teplotního senzoru však byla v nedávné době zpochybněna. Nové experimenty na myších s vyřazeným *Trpv3* genem nepotvrdily důležitý význam TRPV3 iontového kanálu v citlivosti k tepelným stimulům. Oproti kontrolním zvířatům byl pozorován jen malý rozdíl v preferencích pokusných myši bez TRPV3 receptoru pro různé teploty prostředí, a to pouze u jednoho kmene myši.

U jiného kmene zvířat se rozdíl v teplotní citlivosti neprojevil (Huang et al., 2011; Miyamoto et al., 2011). TRPV3 receptory tudíž pravděpodobně nepředstavují hlavní detektor okolní teploty hlodavců. Je však možné, že u lidí se jejich funkční význam liší. Těto domněnce nasvědčuje i skutečnost, že oproti hlodavcům byla u primátů zaznamenána exprese TRPV3 receptorů také v sensorických neuronech (Xu et al., 2002).

### 1.3.1.2 Úloha TRPV3 receptoru ve fyziologii a patofyziologii kůže

Myši s vyřazeným *Trpv3* genem se od kontrolních jedinců liší morfologií srsti. Vousy i chlupy geneticky pozměněných zvířat jsou pokroucené a uspořádání chlupových folikulů je narušeno. Přítomnost TRPV3 receptorů v kožních buňkách je důležitá nejen pro správný růst chlupů, ale také pro proliferaci a diferenciaci keratinocytů a tvorbu epidermální bariéry (Cheng et al., 2010).

Výraznější postižení fyziologické funkce kůže než u *Trpv3* KO myši bylo zaznamenáno u hlodavců, jejichž TRPV3 receptory jsou spontánně aktivní. Při hledání genetického podkladu fenotypu bezsrstých kmenů DS-Nh myši a WBN/Kob-Ht potkanů bylo zjištěno, že oba tyto kmeny mají mutaci na stejné pozici *Trpv3* genu, jež vede k záměně glycinu v S4–S5 klíče TRPV3 receptoru za serin či cystein (G573S a G573C mutace) (Asakawa et al., 2006). V heterologním expresním systému se TRPV3 iontové kanály s danými záměnami vyznačují silně zvýšenou klidovou aktivitou a buňky, které je exprimují, rychle umírají (Xiao et al., 2008b). Předpokládá se, že přítomnost spontánně aktivních TRPV3 receptorů a výsledné snížení životaschopnosti či správné funkce keratinocytů je příčinou fyziologického defektu DS-Nh a WBN/Kob-Ht zvířat. Oba kmeny hlodavců mohou sloužit jako zvířecí modely pro atopickou dermatitidu, neboť u nich dochází ke spontánnímu rozvoji zánětu kůže (Hikita et al., 2002; Asakawa et al., 2005). TRPV3 receptor by tedy mohl být cílem nových účinných látek při léčbě atopického exému a pruritu (Yoshioka et al., 2009).

Homologní mutace jako u spontánně bezsrstých kmenů hlodavců byla nalezena i u lidí s Olmstedovým syndromem. Tato geneticky podmíněná nemoc se vyskytuje velmi vzácně a projevuje se hyperkeratózou v oblasti dlaní, plosek a kolem tělních otvorů. Je spojena se svěděním a vypadáváním vlasů postižených jedinců. Genetickým podkladem tohoto onemocnění může být nejen mutace glycinu v S4–S5 klíče, ale také záměna tryptofanu v TRP boxu TRPV3 receptoru za glycin. Při elektrofyziologických pokusech na mutantních TRPV3 receptorech bylo zjištěno, že obě tyto mutace vedou ke vzniku

spontánně aktivních iontových kanálů. Navíc při pokusech na izolované lidské kůži bylo zjištěno, že aplikace agonistů TRPV3 iontových kanálů inhibuje růst vlasů (Borbiro et al., 2011). Je tudíž zřejmé, že zvýšená aktivita TRPV3 receptorů narušuje správnou funkci keratinocytů a může být podkladem kožních defektů či onemocnění jak u hlodavců, tak u lidí.

### 1.3.2 Aktivační vlastnosti TRPV3 receptorů

Objev spontánně aktivních TRPV3 receptorů s mutací ve spojovací klíče mezi S4 a S5 a v TRP boxu poukazuje na důležitou úlohu těchto oblastí proteinového komplexu ve vrátkování iontového kanálu. Zdá se, že mechanismus vrátkování u TRPV3 a TRPV1 receptorů je alespoň do určité míry konzervován, neboť záměna homologních aminokyselin u TRPV1 vede rovněž k silnému postižení aktivačních vlastností (Valente et al., 2008; Boukalova et al., 2010). Jak zde již dříve bylo uvedeno, mutace glycinu v S4–S5 klíče TRPV1 receptoru za serin se projevuje spontánní aktivitou iontového kanálu. Přítomnost glycinu, jehož postranní řetězec je tvořen samotným atomem vodíku vázaným přímo na  $\alpha$ -uhlík, dodává proteinovým strukturám konformační flexibilitu. Rigidita S4–S5 klíčky způsobená záměnou glycinu za jinou aminokyselinu pravděpodobně vede k upřednostnění otevřeného stavu u TRPV1 i TRPV3 iontových kanálů.

TRPV1 a TRPV3 receptory se však zásadně liší v tom, jak je jejich činnost regulována při opakované či dlouhodobé aplikaci agonisty. Oproti TRPV1 receptorům, jež podléhají desenzitizaci, se aktivita TRPV3 iontových kanálů při prodloužené stimulaci chemickými agonisty či tepelnými podněty zvyšuje (Peier et al., 2002; Xu et al., 2002). Senzitizace TRPV3 receptorů, jež je závislá na koncentraci agonisty a délce jeho aplikace, se projevuje zvýšením pravděpodobnosti otevření, snížením teplotního prahu pro aktivaci a zvýšením citlivosti k depolarizačnímu napětí (Xiao et al., 2008a; Liu et al., 2011). Senzitizace je pravděpodobně vnitřní vlastností TRPV3 iontových kanálů, neboť není závislá na buněčném prostředí. Předpokládá se, že vlastní aktivace receptoru vede k pomalým konformačním změnám, které se projeví na činnosti TRPV3 iontového kanálu (takzvaná hystereze vrátkování) (Liu et al., 2011).

Bylo navrženo několik možných mechanismů, které by mohly zprostředkovávat zvýšení aktivity TRPV3 receptorů. TRPV3 iontové kanály jsou silně inhibovány vápenatými ionty v extracelulárním prostředí. Při dlouhodobé stimulaci zvýšenou

teplotou však dochází k oslabování inhibičního účinku  $\text{Ca}^{2+}$  a u plně senzitivovaného TRPV3 receptoru je amplituda odpovědi již plně nezávislá na přítomnosti vápenatých iontů. Je možné, že aktivace TRPV3 receptoru vede k pomalé ztrátě citlivosti k  $\text{Ca}^{2+}$  působících z vnějšího prostředí (Chung et al., 2005).

Ankyrinová doména TRPV3 receptoru obsahuje vazebné místo pro  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmulin a ATP, jež je konzervováno i u jiných zástupců vaniloidní podrodiny iontových kanálů. ATP má opačné účinky na aktivitu TRPV3 a TRPV1 receptorů. ATP aplikované z intracelulární strany membrány stimuluje TRPV1 receptor, ale brání senzitivaci TRPV3 receptorů. Vazba ATP na ankyrinovou doménu TRPV3 receptoru je závislá na koncentraci divalentních iontů. Zvýšení cytozolické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  při dlouhodobé stimulaci TRPV3 iontových kanálů může tuto interakci oslabit a odstranit tak inhibiční vliv ATP (Phelps et al., 2010). K postupnému zvyšování amplitudy odpovědi TRPV3 receptoru však dochází i za podmínek, kdy iontový kanál není vystaven působení vápenatých iontů (Liu et al., 2011). Výše zmíněné mechanismy tedy plně nevysvětlují senzitivizační fenotyp TRPV3 receptorů.

### **1.3.3 Intracelulární signalizační dráhy ovlivňující činnost TRPV3 receptorů**

Transformující růstový faktor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) a epidermální růstový faktor (EGF) jsou proteinové signalizační molekuly s autokrinními a parakrinními účinky, které jsou zásadní pro regulaci proliferace a diferenciaci keratinocytů (Schneider et al., 2008). Účinky těchto růstových faktorů jsou zprostředkovány aktivací takzvaného EGF receptoru (EGFR) na membráně cílových buněk, jež patří do skupiny receptorů s vnitřní tyrozinkinázovou aktivitou. V nedávné době bylo prokázáno, že TRPV3 receptor tvoří klíčový článek signalizační kaskády spouštěné EGFR (Cheng et al., 2010). U kultivovaných primárních keratinocytů je aktivita TRPV3 iontových kanálů silně stimulována inkubací buněk v přítomnosti TGF- $\alpha$  a EGF. Navíc myši s geneticky vyřazeným genem pro TGF- $\alpha$  či s narušenou funkcí EGFR se vyznačují postiženou morfogenezí chlupů stejně jako *Trpv3* KO zvířata (Mann et al., 1993; Luetke et al., 1994).

Činnost TRPV3 receptoru je ovlivňována růstovými faktory pravděpodobně prostřednictvím fosfolipázy C (PLC), jež je aktivována při stimulaci EGFR (Xu et al., 2006; Cheng et al., 2010). Bylo popsáno několik mechanismů, kterými může PLC

regulovat aktivitu TRPV3 iontových kanálů. Membránový fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( $PIP_2$ ), jenž je štěpen PLC na inositol-1,4,5-trifosfát ( $IP_3$ ) a diacylglycerol (DAG), inhibuje aktivitu TRPV3 receptoru. Snížení koncentrace  $PIP_2$  v membráně v důsledku stimulace PLC se tudíž projeví zvýšenou aktivitou TRPV3 receptoru (Doerner et al., 2011). DAG je prekurzorem pro vznik kyseliny arachidonové a jejích derivátů, které také stimulují TRPV3 receptory pravděpodobně skrze přímou vazbu na proteinový komplex. Navíc DAG spolu s vápenatými ionty aktivuje proteinkinázu C, která rovněž moduluje činnost TRPV3 receptorů (Hu et al., 2006).

Další signalizační kaskádou, která je napojená na EGFR, je MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) dráha, jejímž konečným efektem je fosforylovaná ERK kináza (kináza regulované extracelulárním signálem). Tato kináza aktivuje řadu transkripčních faktorů, ale reguluje také různé jiné proteiny, včetně iontových kanálů. Sekvenční analýza TRPV3 receptoru odhalila několik serinových a tyrozinových aminokyselinových zbytků, které by mohly být ERK kinázou fosforylovány, je tudíž možné, že TRPV3 receptory jsou substrátem tohoto enzymu (Lewis et al., 1998). Úloha ERK kinázy v regulaci aktivity TRPV3 receptoru však doposud nebyla zkoumána.

## 2 Cíle práce

- S využitím bodových mutací ozřejmit úlohu S1 transmembránové oblasti v aktivačních vlastnostech TRPV1 iontového kanálu.
- Stanovit funkční vlastnosti mutantních TRPV1 iontových kanálů vzhledem k pH citlivosti
- Charakterizovat TRPV3 receptory přirozeně exprimované v buněčné linii lidských keratinocytů HaCaT pomocí elektrofyziologických metod.
- Prozkoumat možné intracelulární signalizační dráhy, které by mohly modulovat funkci TRPV3 iontových kanálů.

## 3 Metody

Zdroje použitých materiálů a chemikálií jsou v sekci metody uvedeny v závorkách.

### 3.1 Buněčné kultury

Veškeré pokusy probíhaly na linii lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293T (ATCC) a imortalizovaných lidských keratinocytů HaCaT (CLS).

#### 3.1.1 Kultivace a transfekce HEK293T buněk

HEK293T buňky byly pěstovány v 5% roztoku fetálního telecího séra (FTS) v médiu OPTI-MEM (GIBCO, Invitrogen) při 37 °C a atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> pro zajištění vhodného pH kultivačního roztoku. Buňky byly nasazovány na plastové kultivační nádoby potažené kolagenem a poly-L-lyzinem za účelem zvýšení přilnavosti buněčných membrán k podložce. Pasážování HEK293T buněk probíhalo následovně:

1. Odsátí kultivačního média a opláchnutí buněk pomocí PBS bez přidaných vápenatých iontů.
2. Inkubace buněk v 0,05% trypsinu s 0,016% EDTA. EDTA působí jako chelatační činidlo pro vápenaté ionty. Odstraněním vápenatých iontů z média docílíme narušení buněčných spojů, které jsou na iontech vápníku závislé. Trypsin štěpí peptidické vazby membránových proteinů a tím napomáhá uvolnit buňky z podložky a narušuje mezibuněčné spoje.
3. Mechanická disociace buněk.
4. Nasazení buněk na nové kultivační misky s čerstvým médiem.

Pro experimentální práci byly používány buňky mezi třetí a dvacátou pasáží. Kultura byla pravidelně obnovována ze suspenzí buněk namnožených ihned po zakoupení linie a zamražených v kapalném dusíku.

Buňky byly transfekovány vektorem pcDNA3, který nesl cDNA kódující přirozenou či mutantní formu potkaního podtypu TRPV1 iontového kanálu (250 ng na transfekci). Za účelem rozeznání úspěšně transfekovaných buněk jsme buňky kotransfekovali zeleným fluorescenčním proteinem (GFP; 300 ng na transfekci). Přenos DNA do buněk jsme prováděli metodou MATra (Magnet-assisted Transfection; IBA GmbH). DNA byla smíchána s MATra-A transfekčním činidlem (0,6 µl) v 50 µl média OPTI-MEM. Po 20 minutách inkubace za pokojové teploty byla transfekční směs

aplikována na HEK293T buňky, jež byly následně inkubovány po dobu 15 minut v silném magnetickém poli magnetu MATra při 37 °C. Poté byly buňky pasážovány a nasazeny na měřicí sklíčka. Pokusy jsme prováděli 24–48 hodin po transfekci.

### **3.1.2 Kultivace a transfekce HaCaT buněk**

Linii HaCaT buněk jsme pěstovali v 10% roztoku fetálního telecího séra v médiu D-MEM (GIBCO, Invitrogen) za stejných podmínek jako HEK293T buňky. Nebylo nutné používat kultivační misky potažené kolagenem a poly-L-lysinem, neboť keratinocyty jsou schopny přichytit se na plastový podklad nádobek. Pasážování HaCaT buněk probíhalo obdobně jako u HEK293T buněk, přičemž byla použita vyšší koncentrace trypsinu (0,25%) a EDTA (0,02%). Pro experimentální práci byly použity buňky mezi třetí a dvacátou pátou pasáží.

Vektory pcDNA5/FRT obsahující cDNA kódující lidskou formu TRPV3 receptoru (250 ng na transfekci) spolu s vektory nesoucími reportérový gen GFP (300 ng na transfekci) jsme do HaCaT buněk vnášeli pomocí transfekčního činidla Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 2 µl transfekčního činidla byly smíchány s 50 µl média OPTI-MEM. Po pěti minutách byly do roztoku přidány DNA vektory rozpuštěné v 50 µl média a směs byla inkubována 30 minut za pokojové teploty. Následně byly buňky vystaveny působení transfekční směsi po dobu 5 hodin. Tento postup je sice časově náročnější než u metody MATra, umožnil nám však dosáhnout lepší úspěšnosti transfekce.

## **3.2 Mutagenese**

Přípravu konstruktů s bodovými záměnami jsme prováděli pomocí chemické soupravy QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Mutační primery (Sigma-Aldrich) pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) měly délku minimálně 30 nukleotidů. Jako templát jsme používali DNA kódující přirozenou formu TRPV1 iontového kanálu. Při přípravě konstruktů s dvojitými záměnami sloužila jako templát DNA s již zavedenou bodovou mutací. Po proběhnutí PCR reakce byl produkt inkubován 1 hodinu s restriční endonukleázou DpnI při 37 °C. Tento enzym specificky štěpí metylovanou formu DNA, vyčistí tedy PCR produkt od templátové DNA, která neobsahuje mutaci. Výsledek PCR reakce byl transformován do XL10-Gold kompetentních bakterií, které byly následně nasazeny na agarové plotny v takovém množství, aby narostly samostatné kolonie, každá vzniklá namožením z jedné mateřské buňky. Tímto způsobem je zajištěna genetická totožnost bakterií v jedné kolonii.



Vybrané kolonie byly přeočkovány do zkumavek s LB médiem (médiem Lysogeny Broth) a inkubovány přes noc na třepačce při 37 °C. DNA z namnožených bakterií byla izolována pomocí chemické soupravy Plasmid DNA Miniprep Kit (Life Technologies). Přítomnost požadované mutace v DNA konstruktů byla ověřena pomocí sekvenace (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems).

### **3.3 Elektrofyziologická snímání**

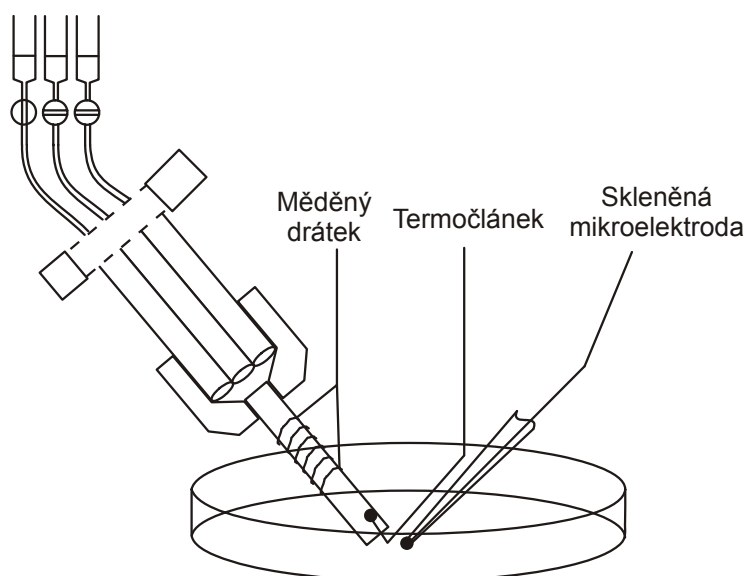
Aparatura použitá pro elektrofyziologická měření sestává z invertovaného mikroskopu Axiovert 135 (Zeiss) umístěného na antivibrační stůl TMC (Technical Manufacturing Co.), zesilovače Axopatch 1-D (Molecular Devices), AD/DA převodníku Digidata 1440A (Molecular Devices) a počítače. Měřicí mikroelektrody byly připravovány před pokusem z trubiček z borosilikátového skla pomocí horizontálního tahače P-1000 (Sutter Instrument Company) tak, aby hrot elektrody měl přibližně 3 μm v průměru. Skleněné mikroelektrody byly naplněny intracelulárním roztokem a umístěny do držáku, který je součástí měřicí aparatury a jehož polohu lze regulovat pomocí mikromanipulátoru (MP-225; Sutter Instrument Company). Elektrické propojení mezi intracelulárním roztokem skleněné mikroelektrody a vstupem zesilovače je tvořeno pomocí stříbrného drátku potaženého vrstvou chloridu stříbrného. Po ponoření do extracelulárního roztoku měly elektrody odpor přibližně 4 MΩ.

Pro elektrofyziologická snímání jsme vybírali samostatné buňky, které nebyly v kontaktu s okolními buňkami. Při práci na transfekovaných buňkách byla dalším kritériem pro výběr exprese zeleného fluorescenčního proteinu. Veškerá elektrofyziologická měření jsme prováděli s využitím metody terčíkového zámku v konfiguraci měření z celé buňky (anglicky *whole-cell patch clamp*) v režimu napěťového zámku. Pokusy probíhaly následovně: skleněná elektroda se pomocí manipulátoru přiblíží k vybrané buňce omývané extracelulárním roztokem. Po kontaktu elektrody s membránou buňky, jenž se projeví zvýšením odporu elektrody, se aplikuje mírný podtlak, který zajistí pevné přilnutí membrány k hrotu elektrody (tzv. *gigaseal*). Vyvinutím silnějšího podtlaku dojde k protržení membrány buňky. V ideálním případě nedojde k narušení kontaktu mezi buněčnou membránou a elektrodou, dojde pouze k propojení intracelulárního prostoru s vnitřkem elektrody. Toto uspořádání umožňuje měření sumárních proudů z celé buňky při definovaném složení intracelulárního

i extracelulárního prostředí. Sériový odpor elektrody jsme standardně kompenzovali na 80 %.

Elektrofyzilogická měření jsme prováděli v režimu napěťového zámku, kdy jsou snímány celkové elektrické proudy tekoucí přes membránu buňky při současném udržování membránového potenciálu na námi zvolené konstantní hodnotě. Pokud není uvedeno jinak, záznamy byly pořizovány při hodnotě membránového potenciálu -70 mV a za pokojové teploty (22–25 °C).

Experimentální roztoky byly na buňky aplikovány pomocí systému, který byl vyvinut v naší laboratoři (Dittert et al., 1998; Dittert et al., 2006) (Obrázek 3.1) a který sestává z několika samostatných ventilků regulujících tok roztoků v teflonových kapilárách. Tyto kapiláry ústí do společné skleněné trubičky, jejíž hrot se pokládá do těsné blízkosti měřené buňky. Kolem vyústění skleněné trubičky je omotán měděný drátek, jehož rozžhavením dochází k ohřívání protékajících roztoků na námi stanovenou hodnotu.



**Obrázek 3.1** Shéma aplikačního systému (Upraveno dle (Dittert et al., 1998)). Systém umožňuje střídavou aplikaci až sedmi různých experimentální roztoků, které jsou umístěny v zásobních nádržkách a pomocí teflonových trubiček svedeny do společné vývodní kapiláry. Ohřívání protékajících roztoků je zajištěno rozžhavením měděného drátku, jenž je omotán kolem kapiláry. V ústí vývodní kapiláry, které se pokládá do těsné blízkosti měřené buňky, se nachází termočlánek zaznamenávající teplotu procházejících roztoků.

### 3.4 Experimentální roztoky a chemikálie

Veškeré chemikálie byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich kromě MEK1/2 inhibitoru U0126, jenž jsme zakoupili u společnosti Cell Signaling.

### 3.4.1 Extracelulární roztok

Složení extracelulárního roztoku bylo následující (mM): NaCl 160, 4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazin ethansulfonová kyselina (HEPES) 10, glukóza 10, KCl 2,5, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 1, pH jsme upravovali pomocí NaOH na hodnotu 7,34. V roztoku bez přidaných vápenatých iontů byl chlorid vápenatý nahrazen 1 mM EGTA. U roztoků s pH < 6 jsme místo HEPES použili 2-(N-morfolino)ethansulfonovou kyselinu (MES), která má vyšší pufrovací schopnost při nižších pH. Při přípravě roztoků se sníženým pH bylo pH standardního extracelulárního roztoku upravováno pomocí roztoku HCl na požadovanou hodnotu. Osmolarita extracelulárního roztoku byla 330 mOsm.

### 3.4.2 Intracelulární roztok

Složení intracelulárního roztoku pro HEK293T buňky (mM): Cs-glukono- $\delta$ -laktón 125, CsCl 15, EGTA 5, HEPES 10, CaCl<sub>2</sub> 0,5, MgATP 2, osmolarita 279 mOsm. Složení intracelulárního roztoku pro HaCaT buňky (mM): Cs-glukono- $\delta$ -laktón 125, CsCl 14, EGTA 5, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 0,5, MgATP 2, NaGTP 0,3, osmolarita 291 mOsm. pH intracelulárních roztoků jsme upravovali pomocí CsOH na hodnotu 7,28.

### 3.4.3 Látky aplikované při elektrofyziologických experimentech

Experimentální roztoky obsahující agonisty TRP receptorů či modulátory signalizačních kaskád byly připravovány v den pokusu smícháním extracelulárního roztoku s požadovaným množstvím zásobního roztoku dané látky. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním látek v etanolu (kapsaicin 0,1M) či DMSO (amilorid 0,5M; 2-APB 1M; karvakrol 2M; PD98059 37,4 mM; U0126 20mM). Epidermální růstový faktor (EGF) byl nejprve rozpuštěn v kyselině octové v množství 1 mg/ml a následně byl zředěn v roztoku 10% fetálního telecího séra v médiu D-MEM s výslednou koncentrací EGF 10  $\mu$ g/ml. Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA) obsažený ve FTS slouží jako nosič EGF a zabraňuje nežádoucí adsorpci peptidu k plastovému povrchu zásobních zkumavek.

### 3.4.4 Látky potřebné pro molekulárně-biologické experimenty

Bakterie jsme pěstovali v LB médiu (Lysogeny Broth médium) o následujícím složení: pepton 5g, kvasnicový extrakt 2,5 g, NaCl 5 g, destilovaná voda 500 ml. Výsledný roztok jsme sterilizovali v autoklávu 15 minut při 105 °C. Před použitím jsme do LB média přidávali ampicilin (100 µg/ml), čímž bylo umožněno namnožení pouze těch bakterií, které obsahovaly námi vložený vektor kódující rezistenci vůči antibiotiku.

Při přípravě agarových ploten jsme do LB média přidali agar (20 mg/ml) a ihned po sterilizaci jsme jej nechali vychladnout v 60°C lázni. Po přidání antibiotika jsme roztok nalévali na Petriho misky a nechali ztuhnout. Hotové plotny jsme uchovávali při 4 °C.

### 3.5 Použitý software

Pro získávání a vyhodnocování elektrofyziologických dat jsme používali program pCLAMP 10 (Molecular Devices). Analýzu získaných dat a jejich statistické zhodnocení jsme prováděli v programu SigmaPlot 10.0 (Systat Software). Pro práci se sekvencemi DNA či proteinů byl využit program BioEdit 7.0 (Hall, 1999). Prostorové modely TRP receptorů jsme prohlíželi v programu VMD 1.8 (Humphrey et al., 1996). Obrázky jsme upravovali v programu CorelDraw 12 (Corel Corporation).

### 3.6 Hodnocení záznamů

#### 3.6.1 Časový průběh nástupu odpovědi TRPV1 receptoru

Pro zhodnocení rychlosti nástupu odpovědi TRPV1 receptoru vyvolaných aplikací kapsaicinu jsme časový průběh membránového proudu prokládali exponenciální funkcí popisující rychlou a pomalou komponentu odpovědi:

$$I(t) = A_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + A_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + C,$$

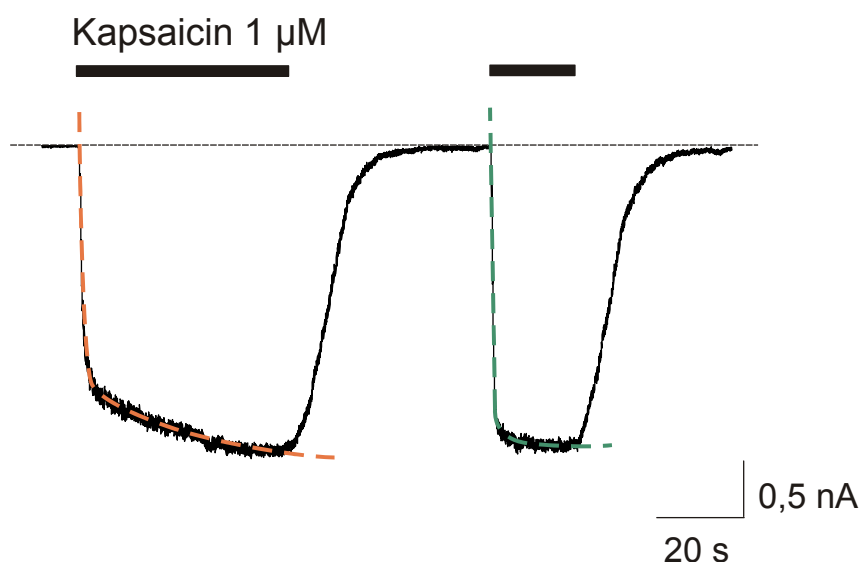
kde  $I(t)$  je okamžitá hodnota proudu v čase  $t$ ;  $A_1$  a  $A_2$  jsou amplitudy rychlé a pomalé komponenty proudové odpovědi;  $C$  je maximální dosažitelná amplituda;  $\tau_1$  a  $\tau_2$  jsou časové konstanty pro rychlou a pomalou komponentu (Obrázek 3.2).

Při hodnocení záznamů jsme porovnávali časové konstanty rychlé a pomalé komponenty, jejichž hodnota odpovídá době, za jakou vzroste amplituda odpovědi

na 63 % ( $100-100/e$ ) maximální amplitudy odpovědi dané komponenty ( $A_1$  a  $A_2$ ), a také míru zastoupení pomalé složky vůči rychlé složce odpovědi:

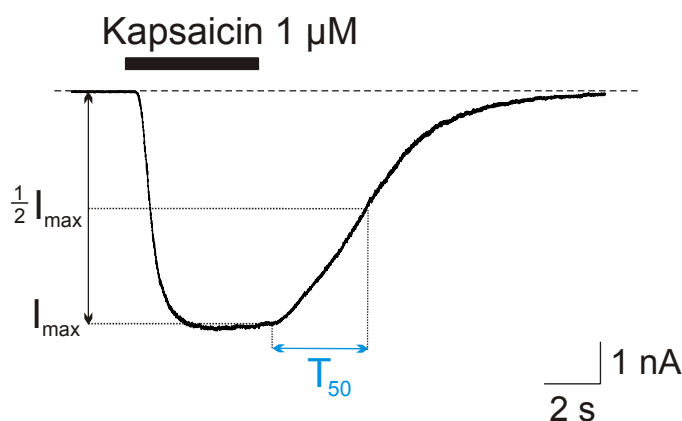
$$A_2\% = A_2 / (A_1 + A_2) \cdot 100.$$

V případech, kdy byla přítomna pouze rychlá ( $\tau \leq 3$  s) či pomalá složka ( $\tau > 3$  s) proudové odpovědi, jsme data prokládali monoexponenciální funkcí ( $A_1$  či  $A_2 = 0$  %).



**Obrázek 3.2** Hodnocení rychlosti nástupu odpovědi TRPV1 receptoru vyvolané kapsaicinem. Barevně jsou znázorněny křivky popisující časový průběh nástupu proudových odpovědí TRPV1 iontového kanálu, který byl stimulován dvěma následnými aplikacemi agonisty. Odpověď na první stimulaci má jasně patrnou pomalou komponentu (oranžová křivka), zatímco u druhé odpovědi silně převažuje rychlá komponenta (zelená křivka).

Deaktivační fázi proudové odpovědi při odmývání kapsaicinu nelze většinou uspokojivě proložit exponenciální funkcí. Rychlost deaktivace jsme jednoduše hodnotili pomocí parametru  $T_{50}$ , který vyjadřuje čas potřebný ke snížení amplitudy proudu na polovinu (Obrázek 3.3).



**Obrázek 3.3** Hodnocení rychlosti deaktivční fáze kapsaicinové odpovědi pomocí parametru  $T_{50}$ .  $T_{50}$  vyjadřuje dobu, za kterou klesne amplituda odpovědi na polovinu.

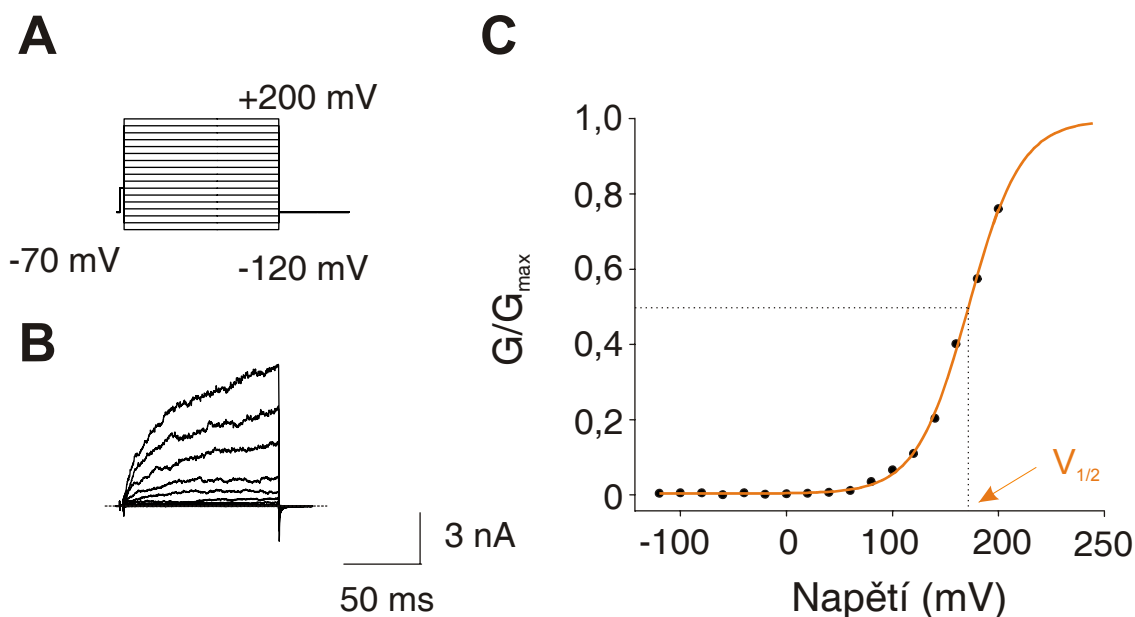
### 3.6.2 Hodnocení napěťové citlivosti

Aktivace přirozených i mutantních forem TRPV1 receptoru vyvolaná depolarizačním napětím byla studována pomocí protokolu, sestávajícího z napěťových skoků, každý aplikovaný po dobu 100 ms, s minimální a maximální hodnotou membránového potenciálu -120 mV a + 200 mV. Rozdíl mezi jednotlivými skoky byl 20 mV (Obrázek 3.4A a B). Velikost membránového proudu jsme odečítali vždy na konci pulzu, kdy už bylo dosaženo rovnovážného stavu. Závislost vodivosti buňky na napětí jsme získali po vydělení takto získaných proudových amplitud příslušnou hodnotou membránového potenciálu zmenšenou o hodnotu reverzního potenciálu. Danou závislost jsme prokládali Boltzmannovou funkcí (oranžová křivka v C):

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

kde  $G_{\max}$  je maximální dosažitelná vodivost buňky;  $G_{\min}$  je minimální dosažitelná vodivost;  $z$  je vrátkovací náboj (anglicky gating charge);  $F$  představuje Faradayovu konstantu ( $F = 96\,485$  C/mol);  $V$  je napětí;  $V_{1/2}$  představuje napětí, při kterém vodivost dosahuje poloviční hodnoty svého maxima;  $R$  zastupuje univerzální plynovou konstantu ( $R = 8,314$  J/(K·mol)) a  $T$  je absolutní teplota.

Citlivost mutantních receptorů s přirozenou formou TRPV1 lze porovnat pomocí hodnoty  $V_{1/2}$  stanovené pro každý konstrukt zvlášť (Obrázek 3.4C). Čím nižší je velikost  $V_{1/2}$  tím vyšší je zdánlivá citlivost daného konstruktu k napětí. Posun v hodnotě  $V_{1/2}$  nemusí přímo odrážet změny v napěťovém senzoru, můžou být také projevem postižení vrátkovacího mechanismu iontového kanálu.



**Obrázek 3.4** Depolarizačními skoky vyvolaná aktivace TRPV1 iontového kanálu. (A) Schéma protokolu užívaného pro stanovení napěťové citlivosti přirozené a mutantních forem TRPV1 iontového kanálu. (B) Reprezentativní záznam proudové odpovědi buňky exprimující přirozenou formu TRPV1 receptoru v odpověď na depolarizační skoky. (C) Závislost vodivosti buňky zobrazené v (B) na napětí. Oranžová křivka představuje ideální proložení dat Boltzmannovou funkcí.

### 3.6.3 Hodnocení teplotní citlivosti

Přesná regulace teploty experimentálních roztoků aplikovaných na měřené buňky nám umožnila stanovit teplotní citlivost TRPV1 konstruktů. Teplota roztoků byla lineárně zvyšována z pokojové teploty až do maximální hodnoty 48 °C. Maximální přírůstek byl 14 °C/s. Teplotní závislost jednotlivých konstruktů jsme porovnávali pomocí hodnoty teplotního koeficientu  $Q_{10}$ , který jsme určili dle vztahu:

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

kde  $A_1$  a  $A_2$  jsou amplitudy proudových odpovědí při teplotách  $T_1$  a  $T_2$ . Pro naše účely jsme zvolili  $T_1 = 42$  °C (teplotní práh pro TRPV1 receptory) a  $T_2 = 45$  °C.  $Q_{10}$  představuje teoretickou míru vzrůstu proudové odpovědi při zvýšení teploty o 10 °C. Čím vyšší je hodnota  $Q_{10}$ , tím vyšší je teplotní citlivost sledovaného jevu.

### 3.7 Statistická analýza

Statistické zhodnocení dat jsme prováděli s využitím programu SigmaPlot 10.0 (Systat Software). Pro jednotlivé skupiny dat byla nejprve určena statistická významnost

pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Pokud jsme našli signifikantní rozdíl ( $P < 0.05$ ), porovnávali jsme jednotlivé skupiny pomocí  $t$ -testu či testu Mann-Whitney. Veškerá data uvedená v této práci jsou vyjádřena ve formě průměrná hodnota  $\pm$  střední chyba průměru. V grafech jsou signifikantně odlišné hodnoty označeny symboly \* $P < 0,001$ ; # $P < 0,01$ ; + $P < 0,05$ .



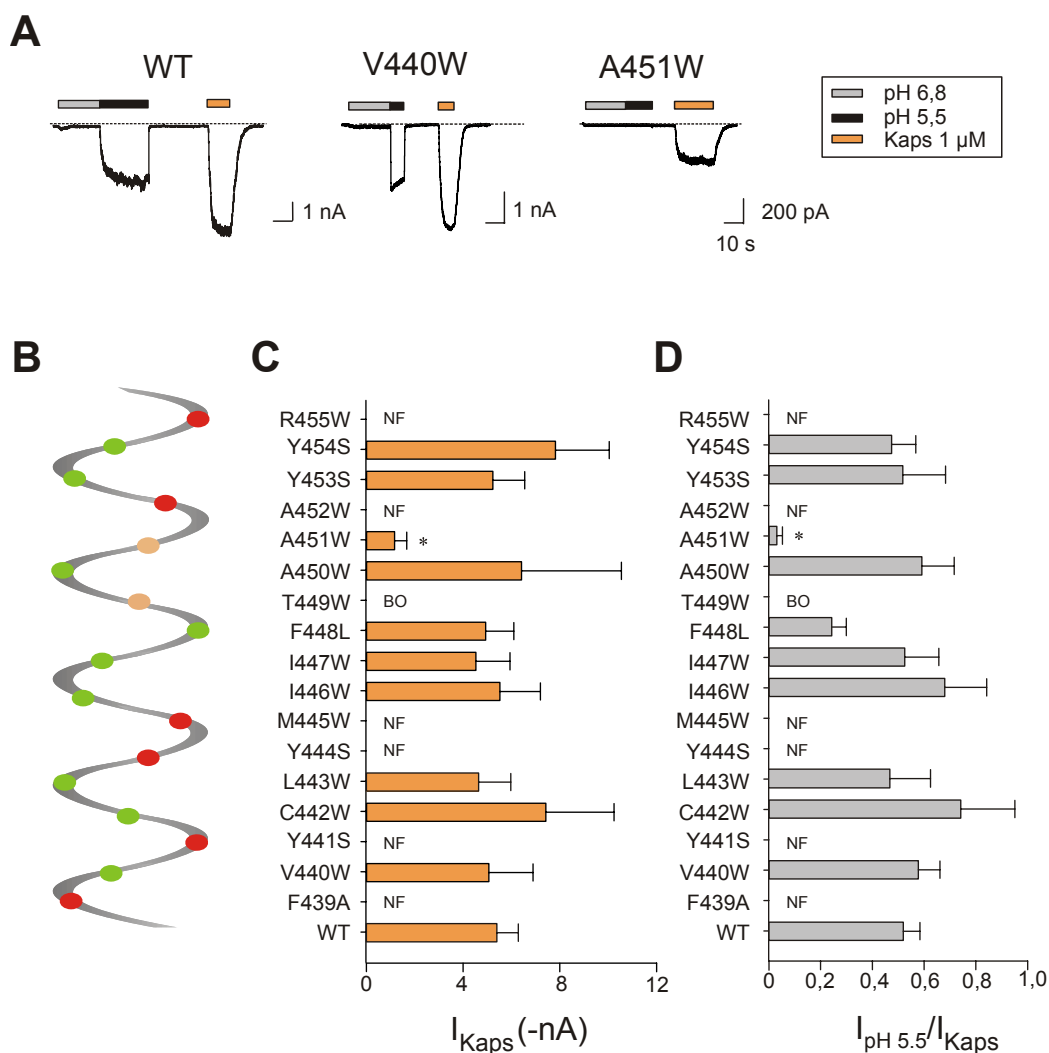
## **4 Výsledky**

### **4.1 Úloha S1 transmembránové oblasti ve funkčních vlastnostech TRPV1 iontového kanálu**

#### **4.1.1 Mutační analýza TRPV1–S1**

Za účelem stanovení významu S1 oblasti ve funkčních vlastnostech TRPV1 iontového kanálu jsme studovali účinek bodových mutací zaváděných jednotlivě po celé délce transmembránového úseku (rezidua F439 až R455). Abychom určili orientaci jednotlivých reziduí vzhledem ke zbytku TRPV1 proteinového komplexu, prováděli jsme bodové záměny za tryptofan, který se vyznačuje hydrofobicitou a relativně velkým objemem vůči ostatním aminokyselinám. Pokud je aminokyselinový zbytek transmembránového úseku orientován směrem do hydrofobního prostředí membrány, jeho záměna za tryptofan by se neměla výrazně projevit na funkčních vlastnostech receptoru. Pokud však reziduum směřuje k přilehlému transmembránovému úseku iontového kanálu, mutace za tryptofan může vést k silnému narušení struktury podjednotky, čímž se poškodí i správná funkce receptoru. Aromatické aminokyselinové zbytky S1 oblasti jsme naopak zaměňovali za rezidua bez aromatického kruhu, abychom oslabili případné interakce s lipidy či s jinými aminokyselinovými zbytky TRPV1 proteinového komplexu.

Funkční vlastnosti mutantních TRPV1 receptorů jsme určovali pomocí měření membránových proudů buněk, které byly přechodně transfekovány TRPV1 konstrukty se zmíněnými bodovými záměnami a které byly stimulovány aplikací kapsaicinu či zvýšením koncentrace protonů v extracelulárním prostředí (pH 5,5). Výsledky jsou shrnuty v obrázku 4.1.



**Obrázek 4.1 Mutační analýza S1 transmembránové oblasti TRPV1 receptoru.** (A) Ukázky membránových proudů buněk exprimujících přirozenou a vybrané mutanční formy TRPV1 receptoru vyvolané snížením pH extracelulárního roztoku (pH 5,5) a kapsaicinem. Před aplikací roztoku o pH 5,5 jsme buňky 20 s omývali extracelulárním roztokem o pH 6,8, abychom vyvolali desenzitizaci iontových kanálů citlivých na pH přirozeně exprimovaných v HEK293 buňkách (Gunthorpe et al., 2001). (B) Předpokládaná  $\alpha$ -helikální topologie S1 segmentu. Zelené symboly označují pozice aminokyselin, jejichž záměna nevedla k postižení aktivačních vlastností TRPV1 receptoru. Oranžovými symboly jsou zaznamenány pozice záměn u mutantů s poškozenou funkcí. Červené symboly zastupují plně nefunkční konstrukty (NF). (C) Průměrná velikost proudových odpovědí vyvolaných aplikací 1  $\mu$ M kapsaicinu pro jednotlivé konstrukty ( $n = 4-31$ ). (D) Velikost odpovědí vyvolaných snížením pH extracelulárního prostředí (pH 5,5) vztažené k amplitudě odpovědi vyvolané 1  $\mu$ M kapsaicinem ( $n = 4-12$ ). BO značí konstrukt, u kterého bylo možné vyvolat proudovou odpověď pouze kombinací chemické a napěťové stimulace. Data byla pořízena při membránovém potenciálu -70 mV.

Šest ze sedmnácti námi připravených konstruktů bylo plně nefunkčních. Buňky exprimující TRPV1 iontové kanály s bodovou záměnou F439A, Y441S, Y444S, M445W, A452W a R455W nevykazovaly žádné proudové odpovědi při stimulaci chemickými agonisty, a to ani v kombinaci se silným depolarizačním napětím, kdy u přirozené formy TRPV1 receptoru dochází k několikanásobnému zvýšení vodivosti buňky. U konstruktu

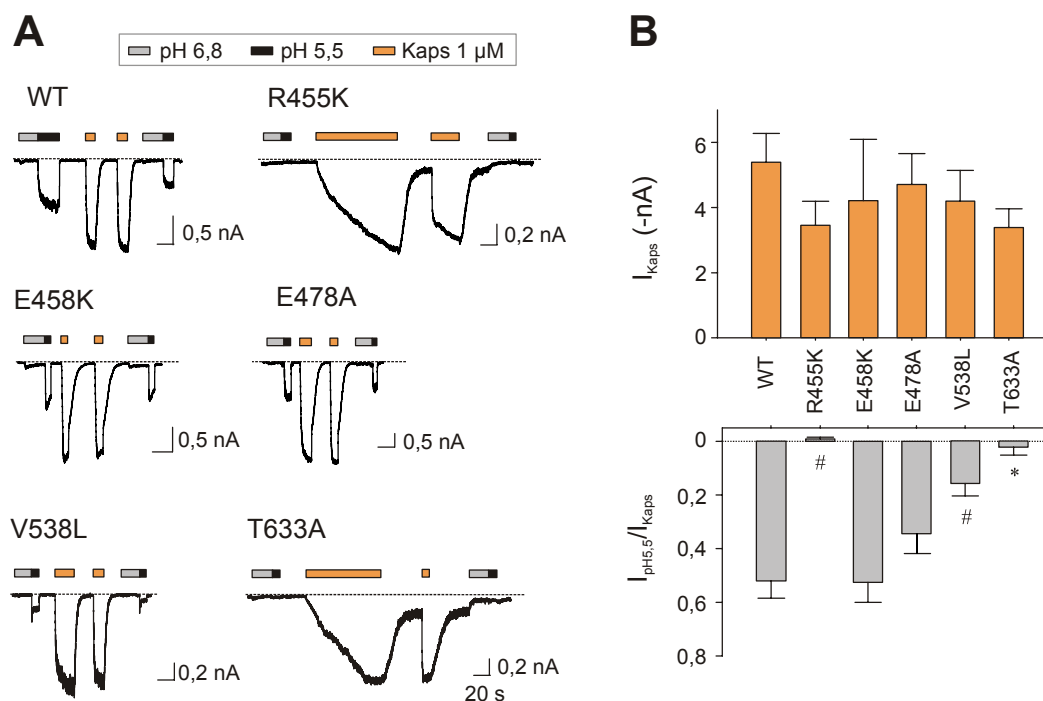
T449W jsme pozorovali pouze malé proudové odpovědi vyvolané kapsaicinem, a to zásadně jen na pozitivních potenciálech. V části S1 segmentu směřující k vnějšímu listu membrány se mutace výrazně poškozující funkci TRPV1 receptoru vyskytují na každé třetí pozici (Obrázek 4.1B), což je periodičita typická pro  $\alpha$ -helikální strukturu. V intracelulární části S1 jsme však žádnou periodicitu ve výskytu funkčních a nefunkčních konstruktů nezaznamenali.

#### 4.1.2 Úloha kladně nabitého rezidua v extracelulární části S1

V dalších experimentech jsme se zaměřili na arginin na extracelulárním konci S1 transmembránové oblasti (R455), jehož záměna za tryptofan vedla ke vzniku plně nefunkčního konstruktů. Při záměně R455 za alanin nedošlo k obnovení funkčních vlastností TRPV1 iontového kanálu, což ukazuje na strukturní význam postranního řetězce na dané pozici. Mutantní receptory se záměnou argininu za jiné kladně nabitě reziduum – lysin – vykazovaly proudové odpovědi při aplikaci 1  $\mu$ M kapsaicinu, jejichž amplituda se signifikantně nelišila od hodnot charakteristických pro přirozený typ TRPV1 iontového kanálu ( $I_{\text{Kaps}} = 5,4 \pm 0,9$  nA pro přirozený typ TRPV1 a  $3,5 \pm 0,7$  nA pro R455K konstrukt;  $n = 31$  a  $22$ ). U R455K konstruktů se však odpovědi při první aplikaci kapsaicinu vyznačovaly výrazně pomalejší rychlostí nástupu. Po odmytí kapsaicinu nedošlo u mutantního receptoru ke snížení membránového proudu na klidovou hodnotu. Plné deaktivace bylo překvapivě dosaženo až po aplikaci extracelulárního roztoku s mírně sníženým pH (pH 6,8). R455K konstrukt byl také plně necitlivý ke stimulačnímu působení protonů (pH 5,5) (Obrázek 4.2). Postranní řetězec lysinu je díky své velikosti i náboji velmi podobný argininu s tím rozdílem, že může vytvářet méně vodíkových vazeb důležitých pro stabilitu proteinu. Výrazná změna fenotypu u iontového kanálu s R455K bodovou záměnou poukazuje na významnou funkční úlohu postranního řetězce na pozici 455.

Zaměřili jsme se na hledání možných interakčních partnerů argininu 455. Dle homologního modelu TRPV1 iontového kanálu se v blízkosti R455 vyskytují dvě záporně nabitá rezidua – E458 na třetí pozici za argininem a E478 umístěný pravděpodobně v extracelulární části S2 transmembránového úseku stejné podjednotky (Brauchi et al., 2007). Abychom odstranili případné elektrostatické interakce mezi těmito aminokyselinovými zbytky a argininem 455, připravili jsme TRPV1 konstrukty, u nichž byl záporný náboj nahrazen pozitivním (E458K), či neutralizován (E478A).

Při elektrofyziologických experimentech jsme u těchto konstruktů nepozorovali žádné signifikantní změny ve velikosti odpovědi vyvolaných kapsaicinem či sníženým pH v porovnání s přirozenou formou TRPV1 iontového kanálu (Obrázek 4.2). Tyto výsledky naznačují, že případné elektrostatické interakce mezi R455 a E458 či E478 nemají klíčový význam ve funkci TRPV1 receptoru.



**Obrázek 4.2** Konstrukty TRPV1–R455K a T633A jsou necitlivé k aktivačním účinkům protonů. (A) Reprezentativní záznamy odpovědi buněk exprimujících přirozené a mutantní formy TRPV1 receptoru vyvolané aplikací roztoku o pH 5,5 a 1  $\mu\text{M}$  kapsaicinem. (B) Průměrné amplitudy kapsaicinových odpovědi (oranžové sloupce) a relativní amplitudy proudových odpovědi při stimulaci sníženým pH (šedé sloupce) pro jednotlivé konstrukty ( $n = 3\text{--}31$ ).

Bodová záměna R455K vedla k odstranění proudových odpovědi při stimulaci roztokem o nízkém pH, amplituda kapsaicinových odpovědi však nebyla signifikantně snížena. Obdobný fenotyp byl popsán u TRPV1 konstruktů se záměnami V538L a T633A (Ryu et al., 2007). Předpokládá se, že tato dvě rezidua hrají významnou úlohu při transdukcii signálu od vazebného místa pro protony k vrátkům TRPV1 iontového kanálu. Abychom porovnali účinek R455K mutace s V538L a T633A záměnami, připravili jsme zmíněné TRPV1 konstrukty a studovali jsme jejich aktivační vlastnosti pomocí stejného protokolu, jaký jsme použili v předchozích experimentech.

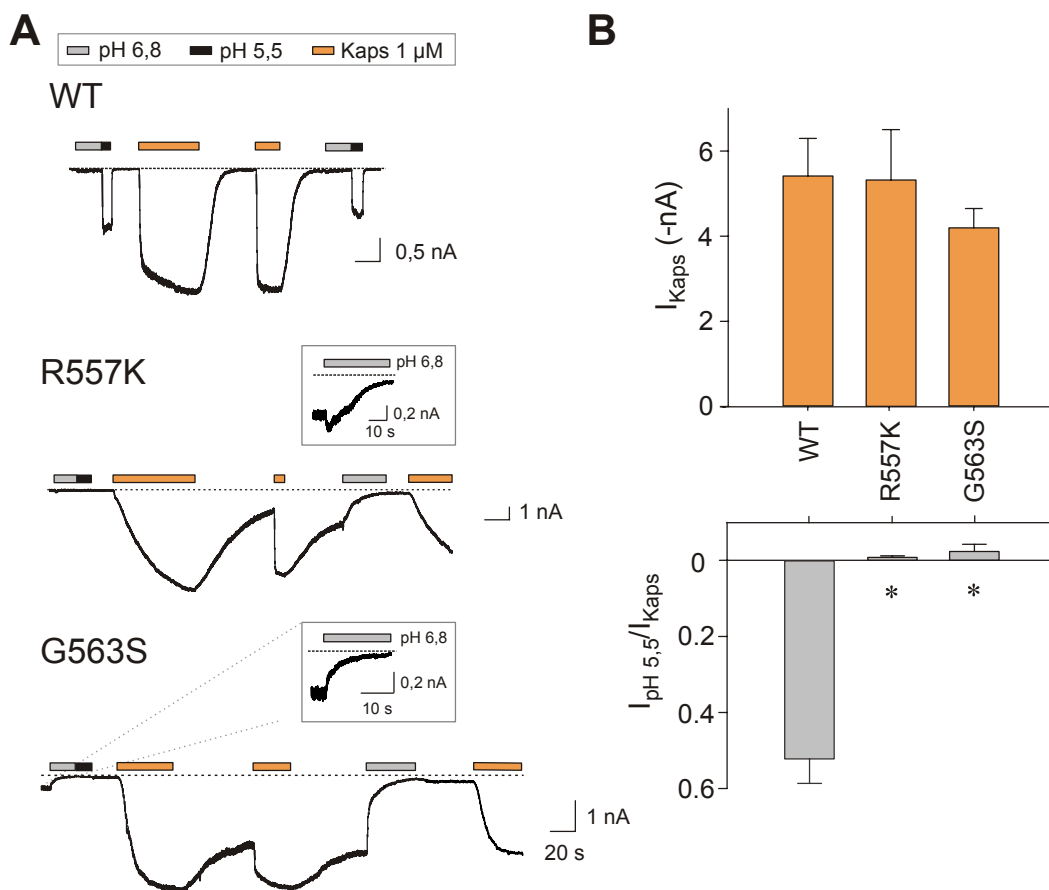
Jak již bylo dříve ukázáno, mutace V538L a T633A postihují citlivost TRPV1 receptoru ke sníženému pH, kapsaicinové odpovědi však zůstávají zachovány (Obrázek 4.2). Průměrná velikost odpovědi na kapsaicin činila v našich podmínkách u V538L

konstruktů  $5,2 \pm 1,0$  nA a u T633A konstruktů  $3,4 \pm 0,6$  nA ( $n = 14$  a  $31$ ). Amplituda pH odpovědí dosahovala v průměru u přirozeného typu TRPV1 kanálu  $52 \pm 6$  % velikosti kapsaicinových odpovědí ( $n = 12$ ), u V538L a T633A byla signifikantně snížena na  $16 \pm 5$  % a  $2 \pm 3$  % ( $n = 5$  a  $9$ ). U T633A konstruktů jsme pozorovali vážnější postižení aktivačních vlastností s velmi podobnými projevy jako u R455K mutantního receptoru, včetně pomalého nástupu odpovědi při první stimulaci kapsaicinem, neúplné deaktivace po odmytí agonisty a inhibičního působení protonů (Obrázek 4.2A). Obdobný fenotyp R455K a T633A konstruktů je překvapivý, vezmeme-li v úvahu vzdálenost pórového helixu, kde se vyskytuje reziduum T633, od S1 transmembránového segmentu v rámci podjednotky TRPV1 iontového kanálu.

#### **4.1.3 Inhibiční působení protonů u spontánně aktivních TRPV1 konstruktů**

Ve své diplomové práci jsem se zabývala úlohou konzervovaných aminokyselinových zbytků v S4 transmembránovém segmentu a S4–S5 klíče vaniloidních TRP receptorů. Jedním z výsledků projektu byl objev mutací, které způsobují zvýšenou aktivitu TRPV1 iontového kanálu (Boukalova et al., 2010). U R557K a G563S mutantů jsme pozorovali výrazně zvýšenou citlivost k napěťové stimulaci, G563S konstrukt dokonce vykazoval zřetelnou spontánní aktivitu i na negativních potenciálech. Oba konstrukty se dále vyznačovaly nápadně zpomaleným nástupem první odpovědi na kapsaicin a neúplnou deaktivací po odmytí agonisty (Obrázek 4.3), citlivost ke sníženému pH však testována nebyla.

V dalších experimentech jsme se zaměřili na stanovení aktivačních vlastností R557K a G563S konstruktů vzhledem k citlivosti k protonům (Obrázek 4.3). Aplikace roztoku o pH 5,5 nevyvolala žádné zvýšení proudových odpovědí u R557K i G563S mutantních iontových kanálů, naopak už mírné snížení pH extracelulárního roztoku (pH 6,8) se projevilo snížením klidového proudu. Inhibiční působení protonů bylo jasně patrné po stimulaci iontových kanálů kapsaicinem, kdy pokles pH extracelulárního prostředí vedl k deaktivaci zbytkového proudu. Podobně jako u R455K a T633A konstruktů byl účinek protonů nevratný. Při přepnutí do standardního extracelulárního roztoku o pH 7,3 nedošlo k významnému zvýšení aktivity mutantních iontových kanálů. Naopak byl nástup následné odpovědi na kapsaicin opět zpomalen (Obrázek 4.3A).



**Obrázek 4.3** Působení protonů na aktivitu R557K a G563S konstruktů. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí buněk exprimujících přirozené a mutantní formy TRPV1 receptoru se zvýšenou aktivitou při stimulaci kapsaicinem a protony. (B) Průměrné amplitudy kapsaicinových odpovědí (oranžové sloupce;  $n = 10\text{--}55$ ) a amplitudy proudových odpovědí při stimulaci sníženým pH normalizované vůči amplitudě odpovědi na 1  $\mu$ M kapsaicin (šedé sloupce;  $n = 6\text{--}13$ ).

#### 4.1.4 Porovnání funkčních vlastností mutantů TRPV1 kanálu necitlivých ke stimulačním účinkům protonů

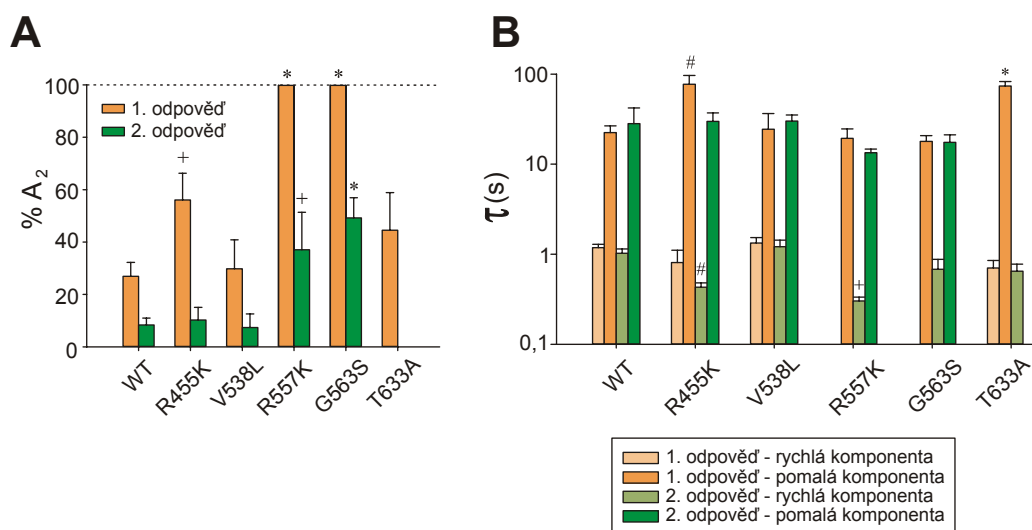
Z dosavadních zjištění vyplývá, že mutace na různých pozicích v rámci transmembránové oblasti TRPV1 podjednotky, jako jsou extracelulární část S1 segmentu (R455K), spojovací klíčka mezi S3 a S4 (V538L), S4/S4–S5 oblast (R557K a G563S) a pórový helix (T633A), mohou způsobit vážné poškození pH citlivosti TRPV1 iontového kanálu při zachování normální velikosti odpovědi vyvolaných kapsaicinem. Abychom zjistili, do jaké míry jsou funkční projevy těchto mutantů shodné, provedli jsme sérii měření zaměřenou na různé aspekty aktivace TRPV1 iontového kanálu.

(i) Rychlost nástupu proudové odpovědi při stimulaci kapsaicinem (Obrázek 4.4):

Jednotlivé TRPV1 konstrukty jsme stimulovali pomocí dvou po sobě následujících aplikací 1  $\mu$ M kapsaicinu a hodnotili míru zastoupení pomalé a rychlé komponenty nástupu kapsaicinové odpovědi a jejich rychlost vyjádřenou časovou

konstantou  $\tau$ . Aby rychlost nástupu kapsaicinové odpovědi nebyla ovlivněna účinky protonů, hodnotili jsme odpovědi pouze těch buněk, které nebyly předem vystaveny působení sníženého pH.

U přirozené formy TRPV1 receptoru byla pomalá komponenta nástupu první kapsaicinové odpovědi zastoupena z  $26,9 \pm 5,3$  % a u následné odpovědi z  $8,6 \pm 2,7$  % ( $n = 34$ ). U R557K a G563S konstruktů došlo k úplnému vymizení rychlé komponenty nástupu první odpovědi na kapsaicin ( $A_2 = 100$  %) a u druhé odpovědi bylo zastoupení pomalé komponenty signifikantně zvýšeno (na  $37,1 \pm 14,3$  % a  $49,2 \pm 7,8$  %;  $n = 8$  a  $9$ ). Kinetika odpovědí na první aplikaci kapsaicinu u R455K a T633A konstruktů byla zpomalena díky zvýšení hodnoty časové konstanty charakteristické pro pomalou komponentu nástupu ( $\tau = 77,1 \pm 19,8$  s a  $73,7 \pm 8,8$  s oproti  $22,4 \pm 4,2$  s u přirozeného typu TRPV1 receptoru;  $n = 5$ – $18$ ). Mutace V538L se na kinetice kapsaicinových odpovědí neprojevila.



**Obrázek 4.4 Kinetika nástupu kapsaicinových odpovědí u konstruktů necitlivých k protonům.** (A) Procentuální zastoupení pomalé komponenty nástupu proudových odpovědí vyvolaných dvěma následnými aplikacemi kapsaicinu ( $n = 9$ – $36$ ). (B) Porovnání časových konstant charakteristických pro pomalou a rychlou komponentu kapsaicinových odpovědí. Aby rychlost nástupu nebyla ovlivněna stabilizačními účinky protonů, hodnotili jsme odpovědi pouze těch buněk, které nebyly předem vystaveny působení sníženého pH ( $n = 4$ – $34$ ).

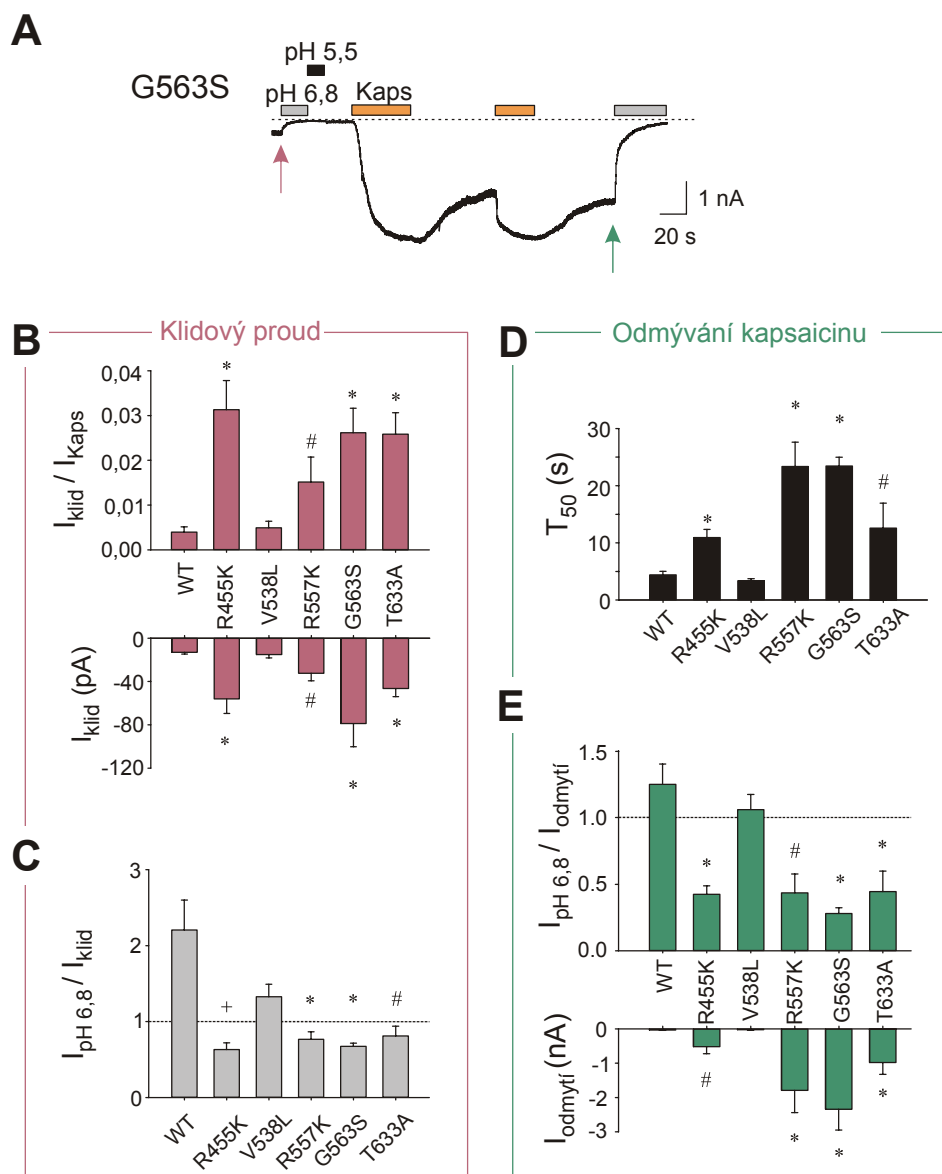
(ii) Odmývací fáze kapsaicinové odpovědi (Obrázek 4.5A,D,E):

Mutace R455K, R557K, G563S a T633A se projevují signifikantně prodlouženou odmývací fází kapsaicinových odpovědí ( $T_{50} = 10,9 \pm 1,4$  s;  $23,4 \pm 4,3$  s;  $23,5 \pm 1,5$  s a  $12,6 \pm 4,4$  s oproti  $4,4 \pm 0,6$  s u přirozeného typu TRPV1 iontového kanálu;  $n = 9-30$ ) a také znemožňují plnou deaktivaci proudové odpovědi po odmytí agonisty. Zbytkový membránový proud dosahoval v průměru  $0,04 \pm 0,01$  nA pro přirozený typ TRPV1 ( $n = 19$ );  $0,52 \pm 0,21$  nA pro R455K ( $n = 18$ );  $1,79 \pm 0,65$  nA pro R557K ( $n = 9$ );  $2,34 \pm 0,61$  nA pro G563S ( $n = 24$ ) a  $0,98 \pm 0,35$  nA pro T633A konstrukt ( $n = 13$ ). Po aplikaci roztoku se sníženým pH (pH 6,8) se u zmíněných mutantů zbytkový proud výrazně zmenšil (na  $42 \pm 6$  % pro R455K,  $43 \pm 14$  % pro R557K,  $28 \pm 4$  % pro G563S a  $44 \pm 15$  % pro T633A konstrukt;  $n = 9-24$ )

(iii) Klidový membránový proud (Obrázek 4.5A,B,C):

Buňky exprimující konstrukty R455K, R557K, G563S a T633A se vyznačují zvýšeným klidovým membránovým proudem ještě před jakoukoli stimulací ( $I_{klid} = 56,0 \pm 13,5$  pA ( $n = 23$ );  $32,5 \pm 6,9$  pA ( $n = 34$ );  $78,9 \pm 21,4$  pA ( $n = 26$ ) a  $46,5 \pm 7,4$  ( $n = 30$ ) oproti  $13,1 \pm 1,5$  ( $n = 81$ ) pro přirozenou formu TRPV1 kanálu). Klidový membránový proud je u těchto TRPV1 mutantů inhibován aplikací extracelulárního roztoku se sníženým pH (na  $63 \pm 9$  %;  $77 \pm 10$  %;  $67 \pm 4$  % a  $81 \pm 13$  %;  $n = 3-21$ ). Naopak u přirozené formy TRPV1 iontového kanálu vede aplikace roztoku o pH 6,8 k potenciaci klidového membránového proudu (na  $221 \pm 39$  %;  $n = 10$ ).



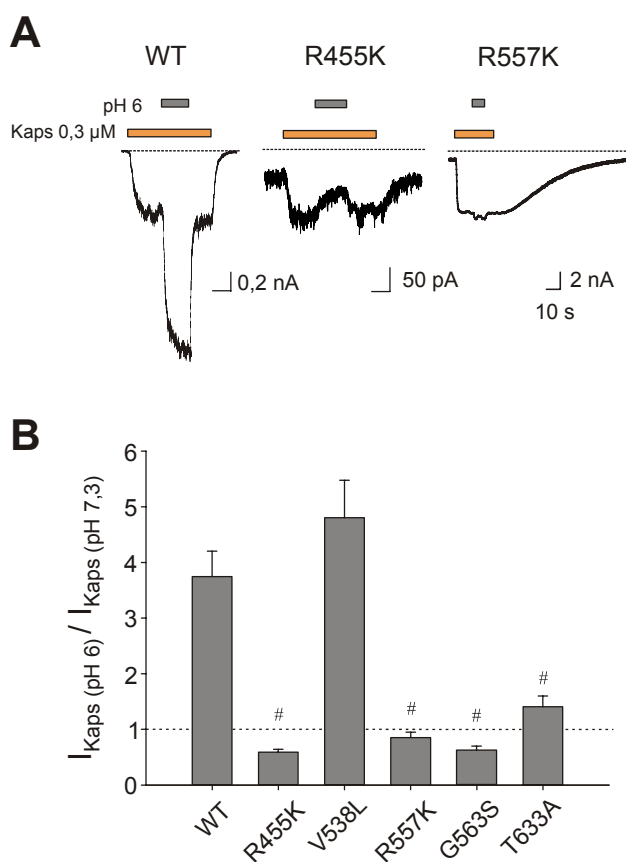


**Obrázek 4.5 Účinek protonů na klidový membránový proud a zbytkový proud po odmytí kapsaicinu.** (A) Repräsentativní záznam odpovědi G563S konstruktů při aplikaci roztoků se sníženým pH a při stimulaci kapsaicinem. (B) Zhodnocení velikosti klidového membránového proudu v absolutní hodnotě (spodní část grafu, růžová šipka v A) a vztahené k amplitudě odpovědi vyvolané 1  $\mu$ M kapsaicinem (horní část grafu) ( $n = 8-81$ ). (C) Amplituda membránového proudu po aplikaci roztoku o pH 6,8 vztahená k velikosti klidového membránového proudu ( $n = 3-21$ ). (D) Rychlost odmývací fáze kapsaicinové odpovědi pro jednotlivé konstrukty vyjádřená hodnotou  $T_{50}$  ( $n = 9-30$ ). (E) Amplituda zbytkového membránového proudu po odmytí kapsaicinu (spodní část grafu, zelená šipka v A) a zhodnocení působení sníženého pH na zbytkový proud (horní část grafu) ( $n = 6-24$ ).

(iv) Účinek současné stimulace kapsaicinem a protony (Obrázek 4.6)

Snížené pH, které samo o sobě nevede k plné aktivaci TRPV1 iontového kanálu ( $pH \geq 6$ ), vyvolává zvýšení membránového proudu stimulovaného aplikací kapsaicinu (Jordt et al., 2000). Pro zhodnocení účinku protonů na kapsaicinem navozenou aktivitu mutantních forem TRPV1 iontového kanálu jsme na experimentální buňky aplikovali 0,3  $\mu$ M kapsaicin rozpuštěný v roztoku s kontrolním pH (pH 7,3) či sníženým pH

(pH 6,0). U V538L konstruktů, podobně jako u přirozené formy TRPV1 receptoru, jsme pozorovali několikanásobné zvýšení amplitudy proudové odpovědi při změně pH (na  $459 \pm 94 \%$  a  $358 \pm 43 \%$ ;  $n = 7$  a  $11$ ). Potenciační účinek protonů byl výrazně snížen u T633A konstruktů (amplituda kapsaicinové odpovědi se v průměru zvýšila pouze na  $141 \pm 20 \%$ ;  $n = 6$ ) a u R455K, R557K a G563S jej nebylo možné vůbec zaznamenat. Naopak, u posledně zmíněných mutantů snížení pH extracelulárního roztoku vedlo ke snížení amplitudy odpovědi vyvolaných kapsaicinem (na  $59 \pm 5 \%$ ;  $82 \pm 9 \%$  a  $60 \pm 7 \%$ ;  $n = 4-6$ ).

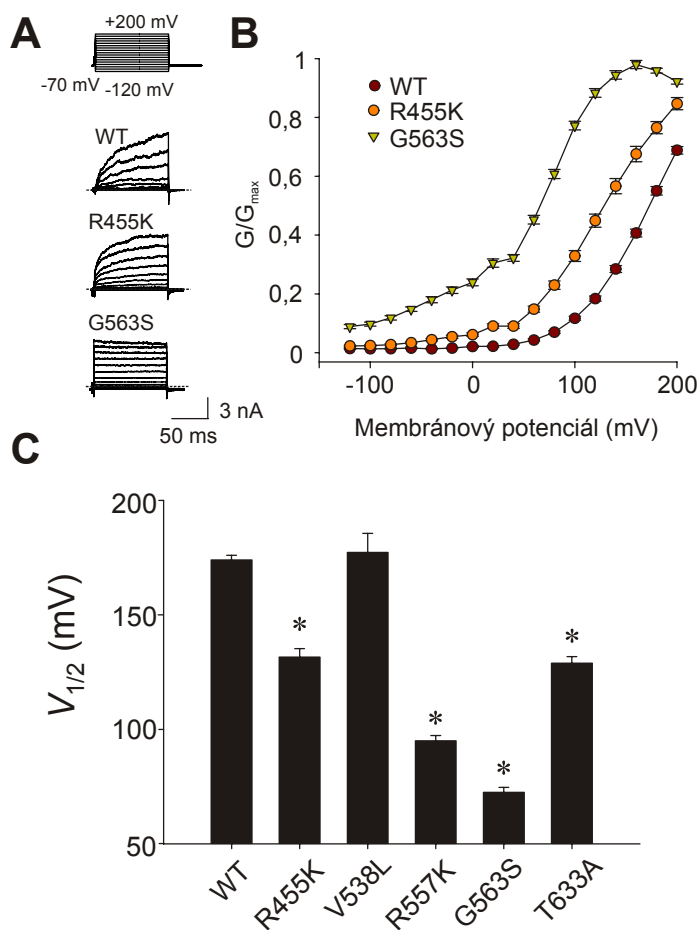


**Obrázek 4.6 Působení sníženého pH na velikost kapsaicinových odpovědí TRPV1 mutantů.** (A) Reprezentativní záznamy buněk exprimujících přirozený typ TRPV1 receptoru a R455K či R557K varianty iontového kanálu vyvolané aplikací 0,3  $\mu$ M kapsaicinu při pH 7,3 (kontrola) a pH 6,0. Záznamy byly pořízeny v přítomnosti 50  $\mu$ M amiloridu, inhibitoru endogenně exprimovaných ASIC iontových kanálů. (B) Sloupcový graf shrnující účinek sníženého pH (pH 6,0) na amplitudu kapsaicinových odpovědí ( $n = 4-11$ ).

(v) Depolarizací vyvolaná aktivace TRPV1 konstruktů (Obrázek 4.7)

Napětíovou závislost TRPV1 iontového kanálu jsme studovali s využitím protokolu sestávajícího ze série napětíových skoků s minimální a maximální hodnotou membránového potenciálu -120 a +200 mV. U přirozené formy TRPV1 receptoru činila

průměrná hodnota membránového potenciálu, při kterém dosahuje vodivost buňky poloviny svého maxima ( $V_{1/2}$ )  $174 \pm 2$  mV ( $n = 58$ ). U konstruktů R455K, R557K, G563S a T633A jsme pozorovali zvýšenou napěťovou závislost, což se projevilo posunem hodnoty  $V_{1/2}$  do oblasti menší depolarizace ( $V_{1/2} = 132 \pm 4$  mV;  $95 \pm 2$  mV;  $72 \pm 2$  mV a  $129 \pm 3$  mV;  $n = 25-40$ ).

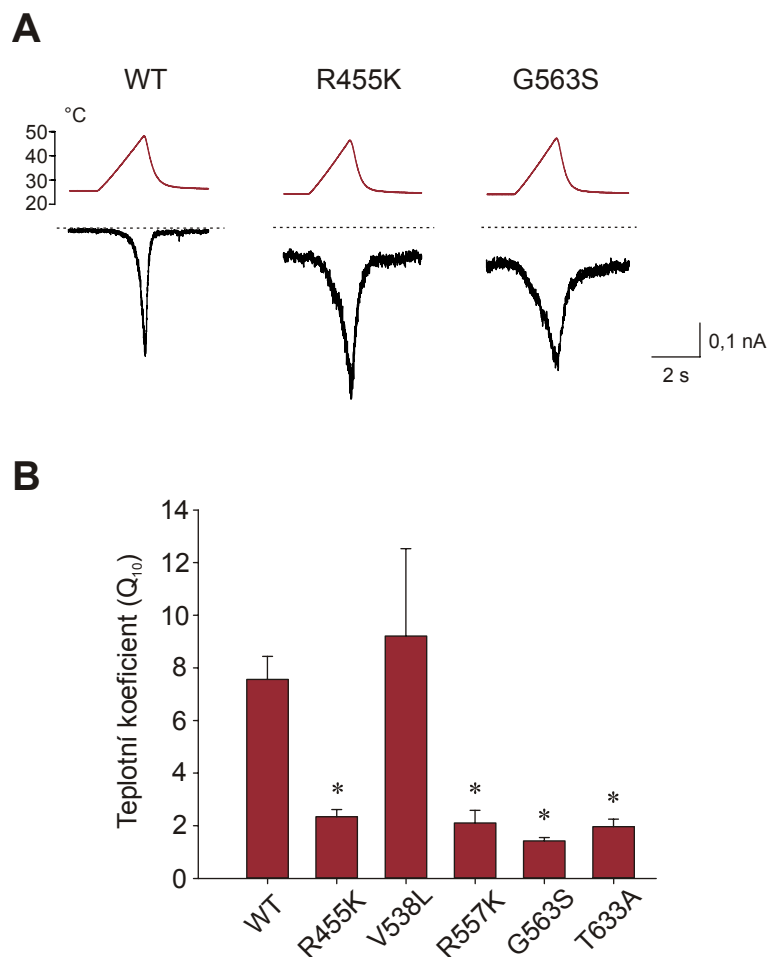


**Obrázek 4.7 Napěťová citlivost TRPV1 konstruktů.** (A) Protokol použitý pro napěťovou stimulaci experimentálních buněk a ukázky membránových proudů pro přirozenou formu TRPV1 receptoru, R455K či G563S mutanty. (B) Průměrná vodivost buněk vyjádřena v závislosti na měnícím se napětí. U R455K a G563S konstruktů došlo k posunutí závislosti směrem k nižším hodnotám membránového potenciálu. (C) Průměrné hodnoty membránového potenciálu, při kterém dosahuje vodivost buňky poloviny svého maxima ( $V_{1/2}$ ) pro jednotlivé konstruktury ( $n = 7-58$ ).

(vi) Teplotní závislost TRPV1 konstruktů (Obrázek 4.8)

Specifickou aktivaci TRPV1 iontových kanálů lze vyvolat i zvýšením teploty prostředí nad 42 °C. Buňky exprimující TRPV1 receptory vykazují při teplotní stimulaci proudové odpovědi, jejichž amplituda a teplotní závislost charakterizovaná teplotním koeficientem  $Q_{10}$  je mnohem vyšší než u nespecifických odpovědí buněk bez teplocitlivých iontových kanálů na membráně. V našich podmínkách jsme určili

hodnotu  $Q_{10}$  pro přirozenou formu TRPV1 receptoru na  $7,6 \pm 0,9$  ( $n = 29$ ). U R455K, R557K, G563S a T633A konstruktů byla teplotní závislost silně postižena, což se projevilo snížením hodnoty teplotního koeficientu ( $Q_{10} = 2,3 \pm 0,3$ ;  $2,1 \pm 0,5$ ;  $1,4 \pm 0,1$  a  $2,0 \pm 0,3$ ;  $n = 9-23$ ). Citlivost na tepelné podněty V538L konstruktů se signifikantně nelišila od nemutované formy TRPV1 ( $Q_{10} = 9,2 \pm 3,3$ ;  $n = 10$ ).



**Obrázek 4.8** Míra teplotní závislosti TRPV1 konstruktů necitlivých k aktivačním účinkům sníženého pH. (A) Reprezentativní záznamy buněk exprimujících přirozenou formu TRPV1 receptoru, R455K a G563S mutanty při aktivaci tepelnými podněty (lineární zvýšení teploty experimentálního roztoku v rozmezí 25–48 °C). (B) Průměrná hodnota teplotního koeficientu ( $Q_{10}$ ) pro jednotlivé konstrukty ( $n = 9-29$ ).

Z našich výsledků vyplývá, že mutace v extracelulární části S1 (R455K), S4/S4–S5 oblasti (R557K a G563S) a pórovém helixu (T633A) se na funkčních vlastnostech iontového kanálu projevují obdobným způsobem a postihují všechny aspekty polymodální aktivace TRPV1 receptoru. Narušená konformace iontových kanálů s danými mutacemi pravděpodobně vede k destabilizaci zavřeného stavu. Důsledkem toho je spontánní aktivita mutantů zvýšena (vyšší klidový membránový proud)

a deaktivace po stimulaci kapsaicinem zpomalena. Zdá se, že snížené pH zavřený stav iontových kanálů se záměnami R455K, R557K, G563S a T633A naopak stabilizuje. Substituce aminokyseliny valinu 538 ve spojovací klíče mezi S3 a S4 za leucin vede ke snížení amplitudy proudu vyvolaného zvýšenou koncentrací protonů v extracelulárním prostředí, potenciační účinky sníženého pH i ostatní funkční charakteristiky TRPV1 iontového kanálu však zůstávají nezměněny.

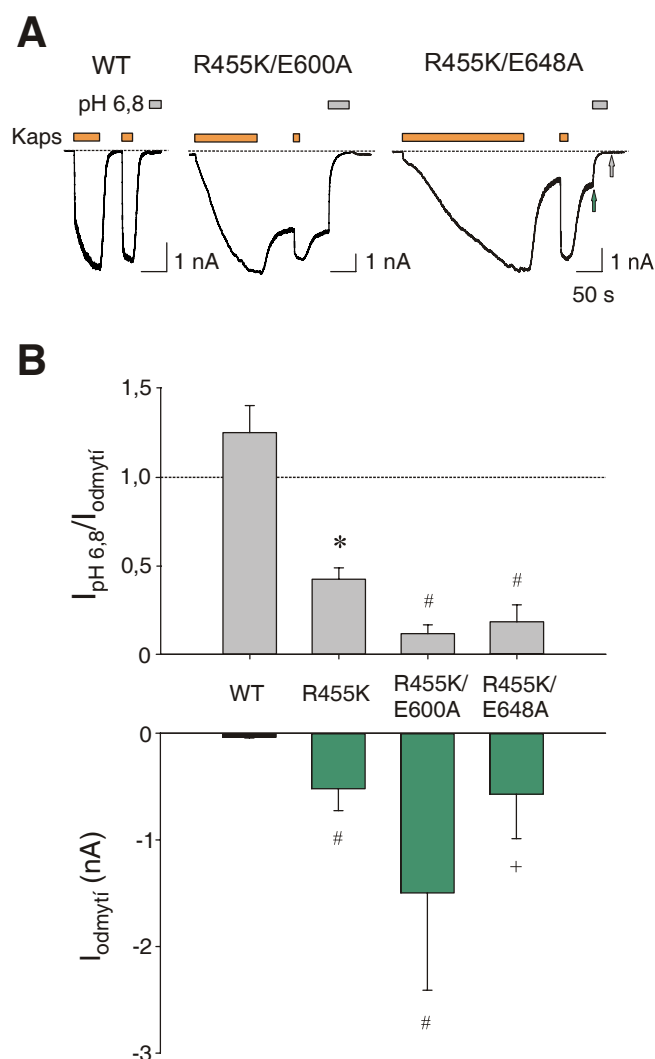
#### **4.1.5 Mechanismus inhibičního působení protonů na aktivitu mutantních TRPV1 receptorů**

V dalších pokusech jsme se zaměřili na objasňování mechanismu, jakým zvýšená koncentrace protonů ve vnějším prostředí umožňuje stabilizaci zavřeného stavu TRPV1 iontových kanálů s mutacemi R455K, R557K, G563S a T633A. Inhibiční účinky sníženého pH se projevují velmi rychle, tudíž jsme předpokládali, že protony působí přímo na TRPV1 iontový kanál. Formulovali jsme dvě hypotézy:

- (i) Protonace glutamátových aminokyselinových zbytků E600 a E648 stimuluje zvýšení aktivity přirozené formy TRPV1 receptoru (Jordt et al., 2000), působí však opačným způsobem na aktivitu mutantních iontových kanálů.
- (ii) Interakce protonů s kyselými aminokyselinovými zbytky v pórové oblasti (E636 a D646) vede ke snížení vodivosti TRPV1 iontového kanálu (Liu et al., 2009) a mohla by být podkladem i inhibičního působení sníženého pH u mutovaných TRPV1 konstruktů.

Za účelem ověření první hypotézy jsme připravili konstrukty s dvojitou bodovou záměnou R455K/E600A a R455K/E648A. U těchto TRPV1 mutantů je odstraněn negativní náboj glutamátových zbytků, čímž je funkčně napodoben protonovaný stav TRPV1 iontového kanálu (Jordt et al., 2000). Stejně jako u R455K konstruktů, iontové kanály se zmíněnými dvojitými záměnami se vyznačovaly výrazně zpomaleným nástupem první odpovědi na kapsaicin a neúplnou deaktivací po odmytí agonisty ( $I_{odmytí} = 1,50 \pm 0,91$  nA pro R455K/E600A konstrukt a  $0,57 \pm 0,42$  nA pro R455K/E648A konstrukt;  $n = 5$  a  $3$ ). Vystavení buněk roztoku o pH 6,8 vedlo k inhibici zbytkového proudu minimálně do stejné míry jako u TRPV1 receptorů s R455K mutací (na  $12 \pm 5$  % pro R455K/E600A a  $18 \pm 10$  % pro R455K/E648A) (Obrázek 4.9). Z těchto výsledků

vyplývá, že inhibiční působení sníženého pH není závislé na protonaci glutamátových reziduí na pozicích 600 a 648.



**Obrázek 4.9 Inhibiční účinek protonů není ovlivněn neutralizací aminokyselinových zbytků E600 a E648.** (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí buněk exprimujících přirozenou formu TRPV1, R455K/E600A a R455K/E648A konstrukty stimulovaných 1 $\mu$ M kapsaicinem a při následné aplikaci roztoku se sníženým pH. (B) Průměrné hodnoty amplitud zbytkového proudu po odmytí kapsaicinu (spodní graf, zelená šipka v A) a zhodnocení působení sníženého pH na zbytkový proud (horní část grafu, šedá šipka v A) ( $n = 3-24$ ).

Dalším známým interakčním místem protonů v rámci TRPV1 receptoru je pórová oblast. Protonace záporně nabitých aminokyselinových zbytků E636 a D646 v oblasti póru vede ke snížení vodivosti TRPV1 iontového kanálu (Liu et al., 2009). Tento inhibiční efekt je u přirozené formy TRPV1 receptoru maskován silnými aktivačními účinky sníženého pH. Úlohu E636 a D646 v inhibičním působení protonů pozorovaném u námi popsáných konstruktů jsme se pokusili stanovit pomocí TRPV1 receptorů s dvojitými záměnami R557K/E636Q, R557K/D646N, G563S/E636Q a G563S/D646N.

E636Q a D646N mutace vedou samy o sobě k postižení vrátkování iontového kanálu a jejich kombinace s R557K a G563S záměnami vedla ke vzniku receptorů se silně poškozenými vrátkovacími vlastnostmi, jež jsme nebyli schopni řádně analyzovat.

#### 4.1.6 Úloha alaninových zbytků v extracelulární části TRPV1–S1

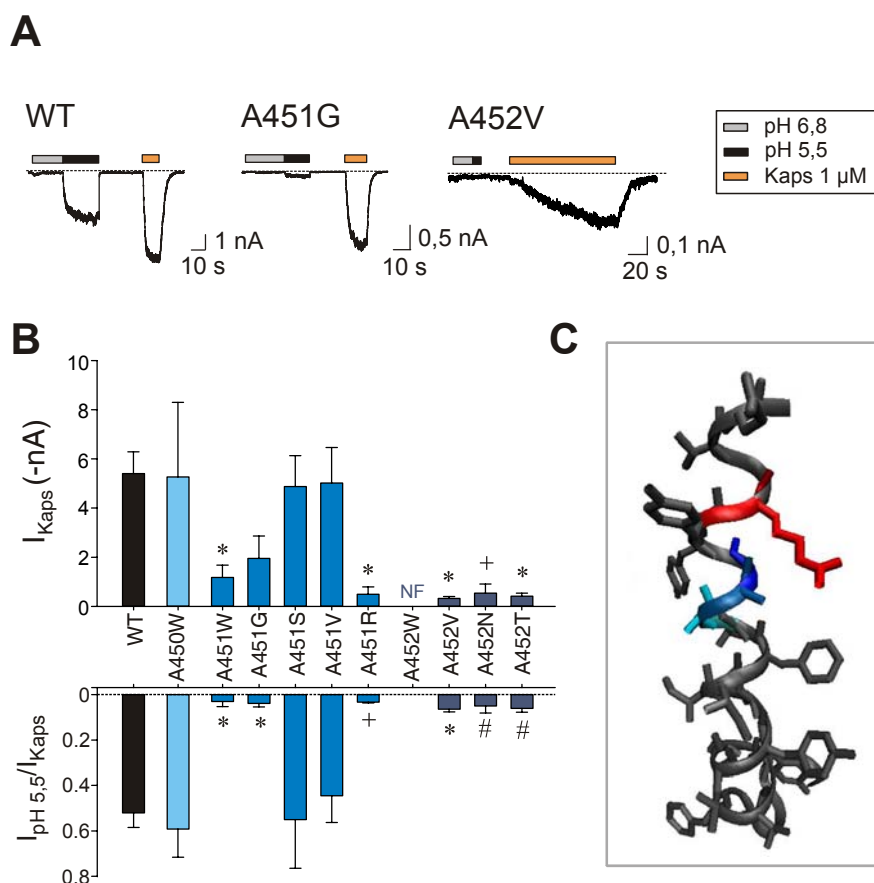
Klíčový význam argininu v extracelulární části S1 transmembránového segmentu je podpořen i jeho přítomností na dané pozici TRPV1 receptoru u nejrůznějších živočišných druhů. Obdobně evolučně konzervován je i alaninový zbytek umístěný na třetí pozici před R455 (Obrázek 4.10), jehož záměna za tryptofan vedla ke vzniku nefunkčního iontového kanálu. Dobrou korelaci míry konzervovanosti s výsledky mutační analýzy jsme zaznamenali i u sousedních dvou alaninových reziduí. U některých ortologů TRPV1 receptoru je alanin na pozici 451 (číslování dle potkaního podtypu TRPV1) nahrazen jinou malou aminokyselinou – valinem a jeho substituce za tryptofan se u potkaního podtypu TRPV1 receptoru projevila sníženou aktivitou při chemické stimulaci. Pozice 450 je variabilní a i přítomnost velké hydrofobní aminokyseliny tryptofanu byla plně tolerována (Obrázek 4.1, str. 42). Abychom podrobněji charakterizovali funkční význam alaninových zbytků na pozicích 451 a 452, rozšířili jsme naši studii o TRPV1 konstrukty s jinou než tryptofanovou záměnou (A451G, A451S, A451V, A451R, A452V, A452N, A452T).

		452	
		↓	
<b><i>Rattus norvegicus</i></b>	439	FVYCLYMIIF <b>TAA</b> YYR	455
<b><i>Homo sapiens</i></b>	440	LVYCLYMIIF <b>TMA</b> YYR	456
<b><i>Mus musculus</i></b>	440	FVYCLYMIIF <b>TTA</b> YYR	456
<b><i>Canis lupus familiaris</i></b>	440	FIYCLYMIIF <b>TTA</b> YYR	456
<b><i>Bos taurus</i></b>	438	FVYCLYMIIF <b>TTV</b> YYR	454
<b><i>Equus caballus</i></b>	439	FVYCLYMIIF <b>TTV</b> YYR	455
<b><i>Desmodus rotundus</i></b>	440	FVYCLYMIIF <b>TTV</b> YYR	456
<b><i>Xenopus laevis</i></b>	450	FAYIIYV <b>TI</b> AAYYR	466

**Obrázek 4.10 Porovnání sekvencí S1 transmembránového segmentu pro vybrané druhy.** Identifikační čísla sekvencí v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>): *Rattus norvegicus*/potkan – AAC53398; *Homo sapiens*/člověk – CAB95729; *Mus musculus*/myš – CAF05661; *Canis lupus familiaris*/pes – AAT71314; *Bos taurus*/tur domácí – DAA18892; *Equus caballus*/kůň domácí – XP\_001504774; *Desmodus rotundus*/upír obecný – AEL30805; *Xenopus laevis*/drápatka vodní – NP\_001177322

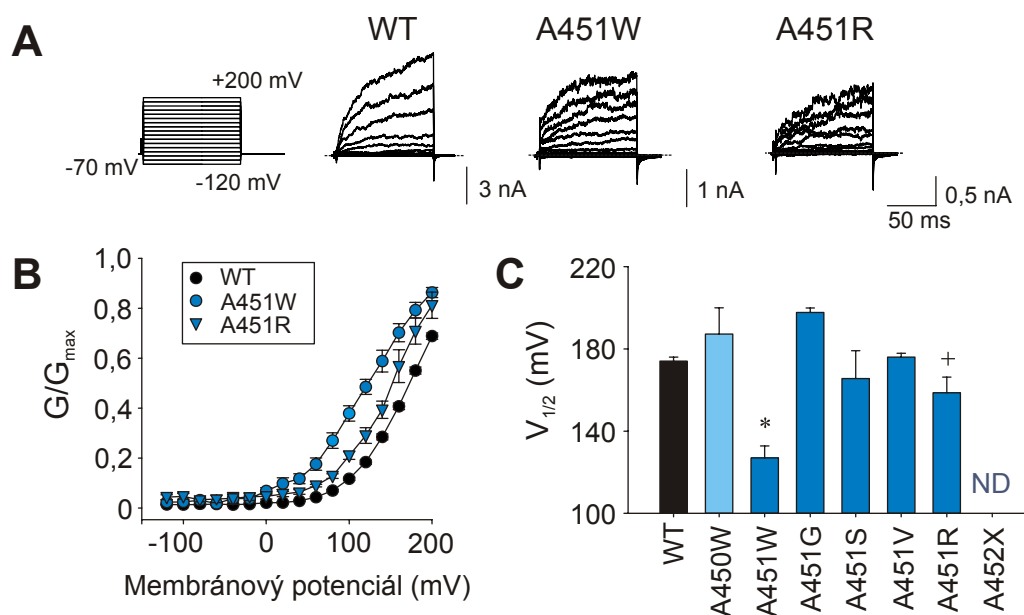
### 4.1.6.1 Konzervativní mutace na pozici 452 silně poškozují funkční vlastnosti TRPV1 iontového kanálu

Jak jsme předpokládali, záměny alaninu na pozici 451 za jiné malé aminokyseliny serin či valin se neprojeví na aktivačních vlastnostech TRPV1 receptoru. Konstrukt s mutací A451G se vyznačoval sníženou citlivostí k aktivačním účinkům protonů, odpovědi na kapsaicin i depolarizační napětí se však významně nelišily od přirozené formy TRPV1. U mutovaného receptoru se záměnou A451R jsme pozorovali podobné fenotypové změny jako u A451W konstruktů – snížení velikosti membránových proudů vyvolaných chemickou stimulací a posun napěťové závislosti do oblasti méně depolarizovaného membránového potenciálu (Obrázek 4.11 a 4.12). Z těchto výsledků usuzujeme, že přítomnost objemných reziduí na pozici 451 brání správné funkci TRPV1 iontového kanálu.



**Obrázek 4.11 Funkční vlastnosti konstruktů TRPV1 receptoru s mutovanými alaninovými zbytky v S1 vzhledem k chemické aktivaci.** (A) Reprezentativní záznamy odpovědi buněk exprimujících přirozený typ TRPV1, A451G a A452V konstruktů při stimulaci roztokem se sníženým pH (pH 5,5) a při aplikaci 1 μM kapsaicinu. (B) Průměrné amplitudy odpovědi na kapsaicin (horní část grafu) a relativní velikost odpovědi vyvolané snížením pH extracelulárního roztoku (spodní část grafu) pro uvedené konstruktů TRPV1 receptoru ( $n = 3-31$ ). (C) Model S1 oblasti TRPV1 receptoru vytvořený na podkladě známé krystalové struktury  $K_{v}1.2$  iontového kanálu převzatý z (Brauchi et al., 2007). Modře jsou vyznačeny A450, A451 a A452, červeně je zakreslen R455.



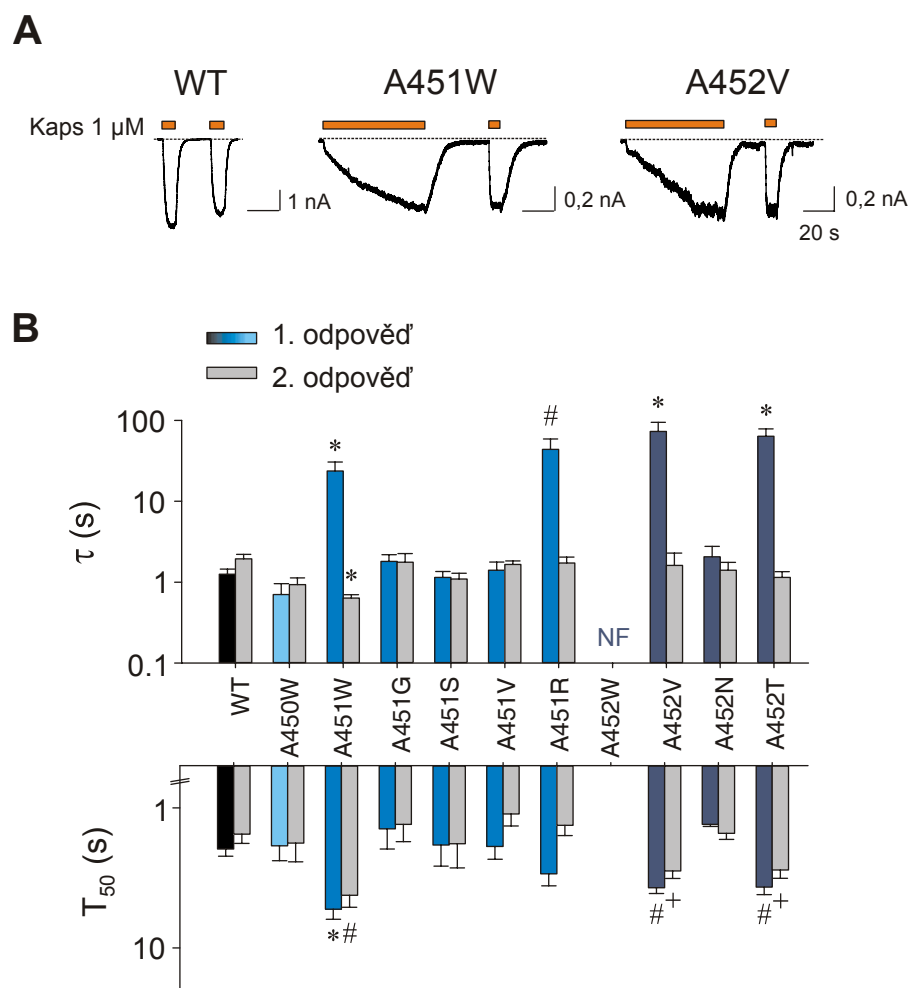


**Obrázek 4.12 Depolarizací vyvolaná aktivace konstruktů s mutovanými alaninovými zbytky v TRPV1–S1.** (A) Ukázky membránových proudů buněk exprimujících přirozené formy TRPV1, A451W a A451R konstruktů při stimulaci protokolem sestávajícím ze série napěťových skoků od -120 mV do +200 mV. (B) Normalizovaná vodivost buněk vynesena v závislosti na hodnotě membránového potenciálu. (C) Průměrné hodnoty napětí, při kterém dosahuje vodivost buňky poloviny svého maxima ( $V_{1/2}$ ) pro uvedené konstruktů ( $n = 3-58$ ). U TRPV1 receptorů s mutovaným A452 aminokyselinovým zbytkem byly odpovědi na napěťovou stimulaci příliš malé a hodnotu  $V_{1/2}$  nebylo možné určit (ND).

Poměrně konzervativní mutace alaninu na pozici 452 za valin či treonin vedla ke vzniku TRPV1 receptorů se silně postiženou chemickou i napěťovou citlivostí (Obrázek 4.11 a 4.12). Je tedy zřejmé, že přesná konformace S1 transmembránového segmentu v daném místě je klíčovou pro zachování aktivačních vlastností TRPV1 iontového kanálu.

#### 4.1.6.2 Zpomalený nástup odpovědi na kapsaicin u konstruktů s mutací na pozicích 451 a 452

Funkční postižení mutantních receptorů se záměnami na pozicích 451 a 452 se neprojevovalo pouze snížením amplitudy membránových proudů stimulovaných chemickými agonisty, ale i změnou kinetiky odpovědi na kapsaicin. Podobně jako u konstruktů se zvýšenou aktivitou byl nástup první kapsaicinové odpovědi u A451W, A451R, A452V a A452T mutantů výrazně zpomalen. Zmíněné mutantní receptory (kromě A451R konstruktů) se také vyznačovaly prodlouženou deaktivací fází odpovědi na kapsaicin (Obrázek 4.13).

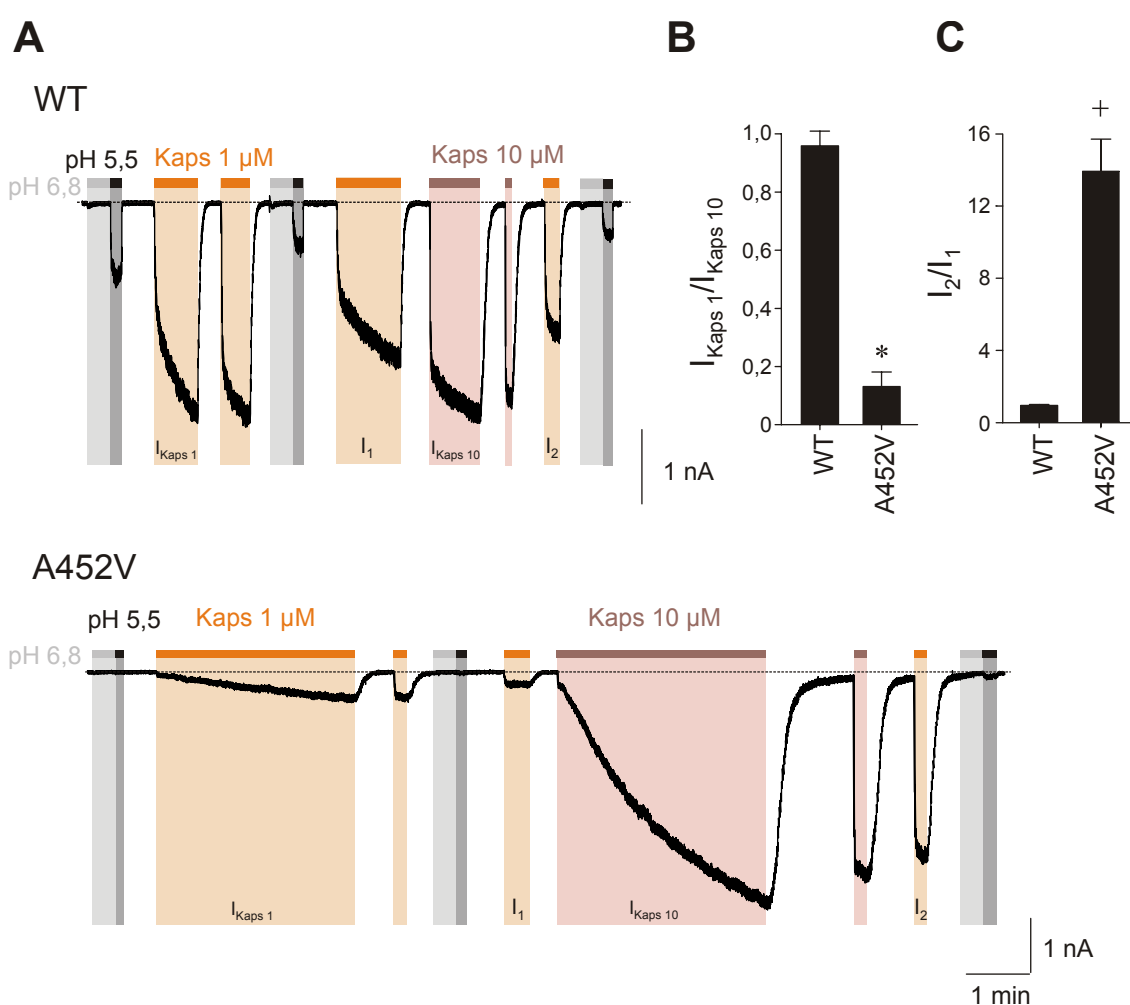


**Obrázek 4.13 Kinetika nástupu odpovědí na dvě následné aplikace kapsaicinu u konstruktů s mutovanými rezidui na pozicích 450, 451 a 452.** (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí buněk exprimujících přirozenou formu TRPV1, A451W a A452V konstrukty při stimulaci 1  $\mu$ M kapsaicinem. (B) Kinetika nástupu první a druhé odpovědi na kapsaicin (horní část grafu) a zhodnocení rychlosti odmývací fáze kapsaicinových odpovědí (spodní část grafu) pro jednotlivé konstrukty. Pro zjednodušení analýzy byla data pořízena v přítomnosti 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  v extracelulárním prostoru. Za těchto podmínek lze získané záznamy odpovědi na kapsaicin prokládat jednoduchou exponenciální funkcí (projevuje se pouze pomalá či rychlá komponenta odpovědi) ( $n = 3-19$ ).

#### 4.1.6.3 Hystereze vrátkování u mutantních receptorů se záměnou alaninu 452

U mutantních receptorů může být menší amplituda odpovědí na kapsaicin způsobena různými mechanismy, například nižší mírou exprese na povrchu buňky, změnou vodivosti či vrátkovacích vlastností iontového kanálu, nebo sníženou citlivostí k aktivačnímu signálu. Abychom zjistili, zda se citlivost ke kapsaicinu u mutantních receptorů liší, porovnávali jsme amplitudy odpovědí vyvolaných 1 a 10  $\mu$ M koncentrací agonisty (Kaps 1 a Kaps 10). 1  $\mu$ M koncentrace kapsaicinu je téměř saturační pro přirozenou formu TRPV1 receptoru ( $I_{Kaps\ 1}/I_{Kaps\ 10} = 0,96 \pm 0,05$ ;  $n = 4$ ; Obrázek

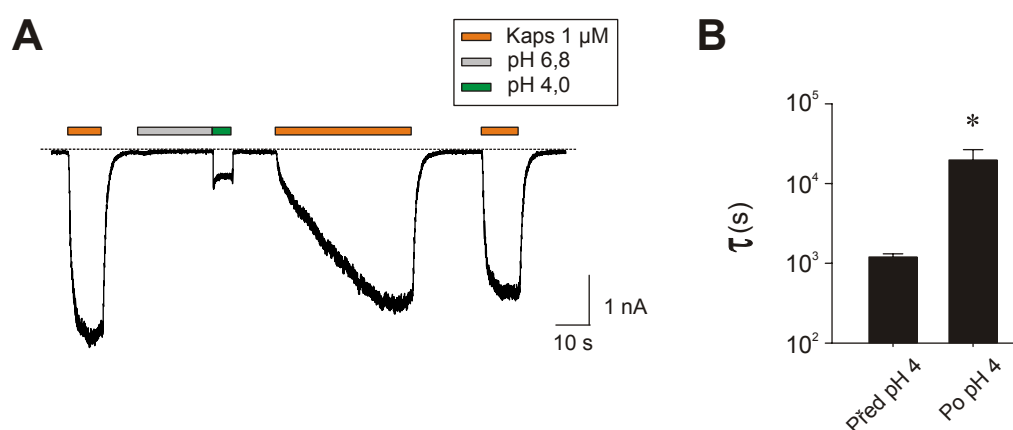
4.14A,B). U A452V konstruktů byla proudová odpověď při stimulaci Kaps 10 několikanásobně vyšší než předcházející odpověď na Kaps 1 ( $I_{Kaps 1}/I_{Kaps 10} = 0,13 \pm 0,05$ ;  $n = 6$ ), což poukazuje na sníženou citlivost iontového kanálu ke kapsaicinu. Pokud byl Kaps 1 aplikován až po stimulaci Kaps 10, amplituda odpovědi byla překvapivě výrazně vyšší (Obrázek 4.14A,C). Zdá se tedy, že vazba kapsaicinu na mutantní TRPV1 receptor nevede pouze k bezprostřednímu otevření iontového kanálu, ale má i dlouhodobější senzitivizační účinky – zvyšuje zdánlivou citlivost receptoru a podněcuje zrychlení nástupu kapsaicinových odpovědí. Citlivost A452V konstruktů ke sníženému pH prostředí však není ani po stimulaci Kaps 10 obnovena (Obrázek 4.14A).



**Obrázek 4.14 Velikost kapsaicinových odpovědí je závislá na předchozí aktivaci A452V konstruktů.** (A) Reprezentativní záznamy membránových proudů buněk exprimujících přirozenou formu TRPV1 receptoru a A452V konstrukt při stimulaci chemickými agonisty. (B) Amplituda membránových proudů při první aplikaci 1 μM kapsaicinu ( $I_{Kaps 1}$ ) vztažená k velikosti odpovědi vyvolaných 10 μM kapsaicinem ( $I_{Kaps 10}$ ) ( $n = 4$  a  $6$ ). (C) Poměr velikosti odpovědí buněk na 1 μM kapsaicin před ( $I_1$ ) a po ( $I_2$ ) stimulaci 10 μM kapsaicinem ( $n = 4$  a  $5$ ). Záznamy jsme pořídili v extracelulárním roztoku bez přidávaných vápenatých iontů pro zabránění desenzitizace TRPV1 receptoru (Koplas et al., 1997).

#### 4.1.7 Desenzitizační působení protonů na aktivitu TRPV1 receptoru

V průběhu našich pokusů zaměřených na stanovení citlivosti k chemickým agonistům jsme u přirozené formy TRPV1 receptoru často pozorovali zpomalení nástupu odpovědi na kapsaicin po vystavení působení sníženého pH. Pro statistické zhodnocení zmíněného efektu jsme buňky exprimující TRPV1 receptor střídavě stimulovali 1  $\mu$ M kapsaicinem a extracelulárním roztokem se silně kyselým pH (Obrázek 4.15). Aplikace roztoku o pH 4,0 vedlo k prodloužení časové konstanty nástupu následné odpovědi na kapsaicin o více jak jeden řád. Kinetika nástupu kapsaicinových odpovědí po vystavení působení silně kyselého pH tedy připomíná projevy mutantních receptorů popsaných výše.



**Obrázek 4.15** Desenzitizační účinky sníženého pH na aktivitu TRPV1 receptoru. (A) Typická odpověď buňky exprimující přirozenou formu TRPV1 receptoru při stimulaci kapsaicinem a roztokem se sníženým pH (pH 4,0). (B) Časová konstanta nástupu odpovědi na kapsaicin před a po vystavení působení roztoku o pH 4,0 ( $n = 7$ ).

#### 4.2 Modulační účinky epidermálního růstového faktoru na aktivitu TRPV3 receptoru

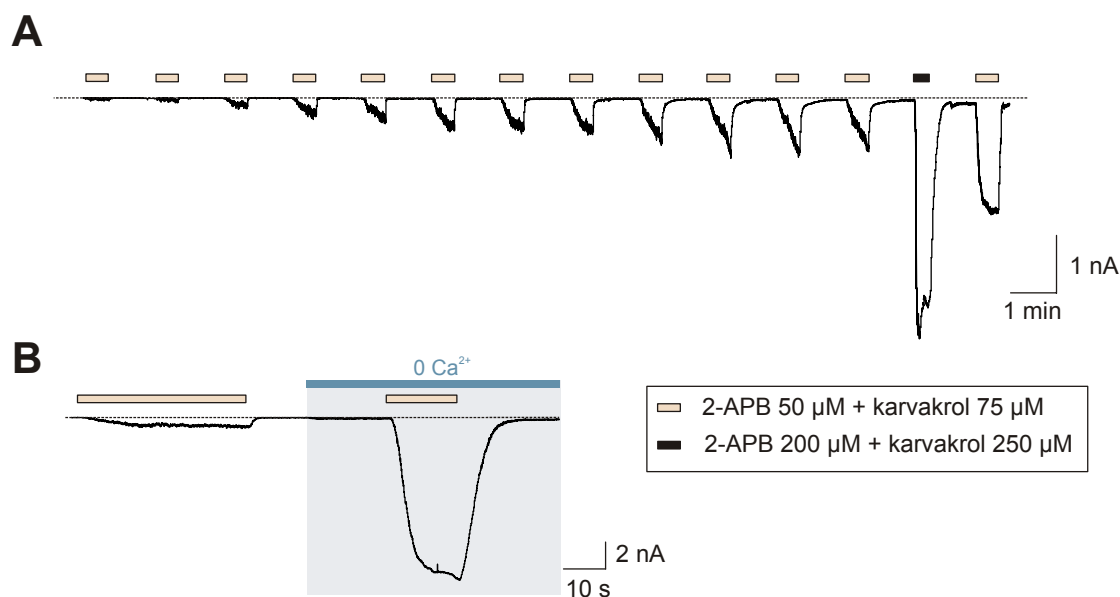
V nativním systému je aktivita TRPV1 receptoru ovlivňována množstvím regulačních faktorů. V rámci studia buněčných mechanismů nocicepce byla popsána řada intracelulárních signálních drah, jejichž stimulace vede k senzitivaci TRPV1 receptoru, což může být podkladem vzniku některých patologických bolestivých stavů (Touska et al., 2011). Naproti tomu buněčné mechanismy regulace aktivity TRPV3 receptoru nejsou doposud příliš prozkoumány. Ve druhé části své dizertační práce jsem se proto zaměřila na hledání možných signálních drah, které působí na funkci TRPV3 iontového kanálu.

V nedávné době byla popsána důležitá úloha TRPV3 receptoru v signalizační dráze růstových faktorů TGF- $\alpha$  a EGF, která je zásadní pro správnou fyziologickou funkci keratinocytů. Kultivace primárních keratinocytů v médiu s přidanými růstovými faktory po dobu několika hodin vedla ke zvýšení aktivity TRPV3 receptoru při stimulaci chemickými agonisty (Cheng et al., 2010). V návaznosti na tato zjištění nás zajímalo, zda i krátkodobá aplikace růstového faktoru se projeví na fungování TRPV3 iontového kanálu.

#### **4.2.1 Charakterizace funkčních vlastností TRPV3 receptoru**

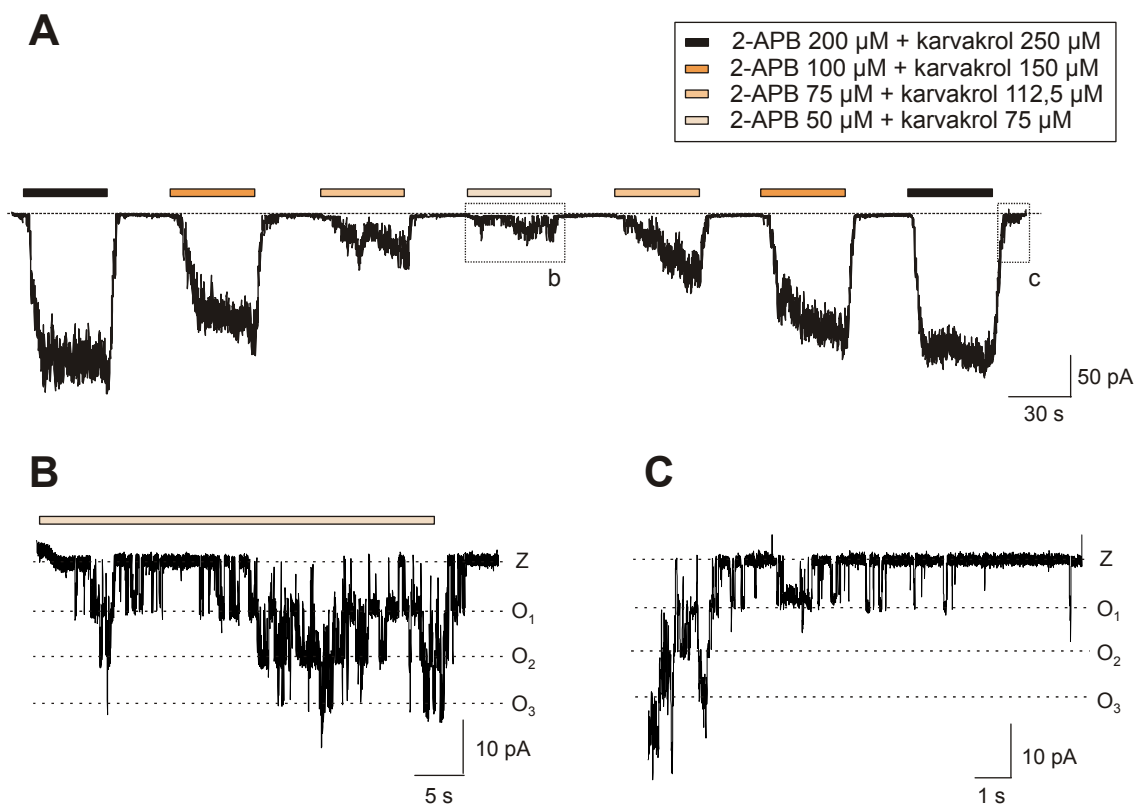
Experimenty jsme prováděli na linii imortalizovaných lidských keratinocytů (HaCaT), které přirozeně exprimují TRPV3 receptory (Sherkheli et al., 2009). V našich podmínkách jsme byli schopni zaznamenat specifické proudové odpovědi při stimulaci agonisty TRPV3 receptoru pouze u malého procenta HaCaT buněk, které se vizuálně nijak nelišily od jiných buněk v kultuře. Z tohoto důvodu jsme v přípravných pokusech zaměřených na optimalizaci stimulačního protokolu buňky nejprve transfekovali vektory nesoucími cDNA lidského podtypu TRPV3. HaCaT buňky s uměle zvýšenou expresí TRPV3 iontového kanálu jsme stimulovali pomocí směsi aktivátorů (2-APB a karvakrolu) a studovali jejich proudové odpovědi.

Charakteristickou vlastností TRPV3 receptoru je postupné zvyšování amplitudy odpovědí při opakované chemické či teplotní stimulaci (Xu et al., 2002) (Obrázek 4.16A). Velikost odpovědí je tudíž určována nejen mírou exprese, ale i aktivační historií TRPV3 receptoru. Prahová teplota pro aktivaci TRPV3 se pohybuje kolem 33 °C, proto již během inkubace v termostatu jsou buňky exprimující teplocitlivé iontové kanály vystaveny stimulačnímu působení tepla, což může vést k senzitivaci ještě před vlastním začátkem měření. Aplikací roztoku s vysokou koncentrací agonisty (v našem případě 200  $\mu$ M 2-APB v kombinaci s 250  $\mu$ M karvakrolu) lze dosáhnout urychlení senzitivizačního procesu (Obrázek 4.16A). V experimentech zaměřených na stanovení akutního účinku EGF jsme HaCaT buňky nejprve stimulovali saturační koncentrací agonistů, čímž jsme dosáhli maximální senzitivace a jednotlivé záznamy pořízené z různých buněk pak bylo možné mezi sebou porovnávat.



**Obrázek 4.16 Charakterizace proudových odpovědí HaCaT buněk s uměle zvýšenou expresí TRPV3 receptorů.** (A) Záznam proudových odpovědí při opakované stimulaci směsí agonistů aplikovaných v nízké koncentraci (50 μM 2-APB s 75 μM karvakrolu). Maximální odpovědi bylo dosaženo aplikací roztoku obsahujícího vysokou koncentraci agonistů (200 μM 2-APB s 250 μM karvakrolu). Měření jsme prováděli v extracelulárním roztoku s 1 mM Ca<sup>2+</sup>. (B) Odstranění vápenatých iontů z extracelulárního prostoru vede k silnému zvýšení proudových odpovědí HaCaT buněk stimulovaných směsí TRPV3 agonistů.

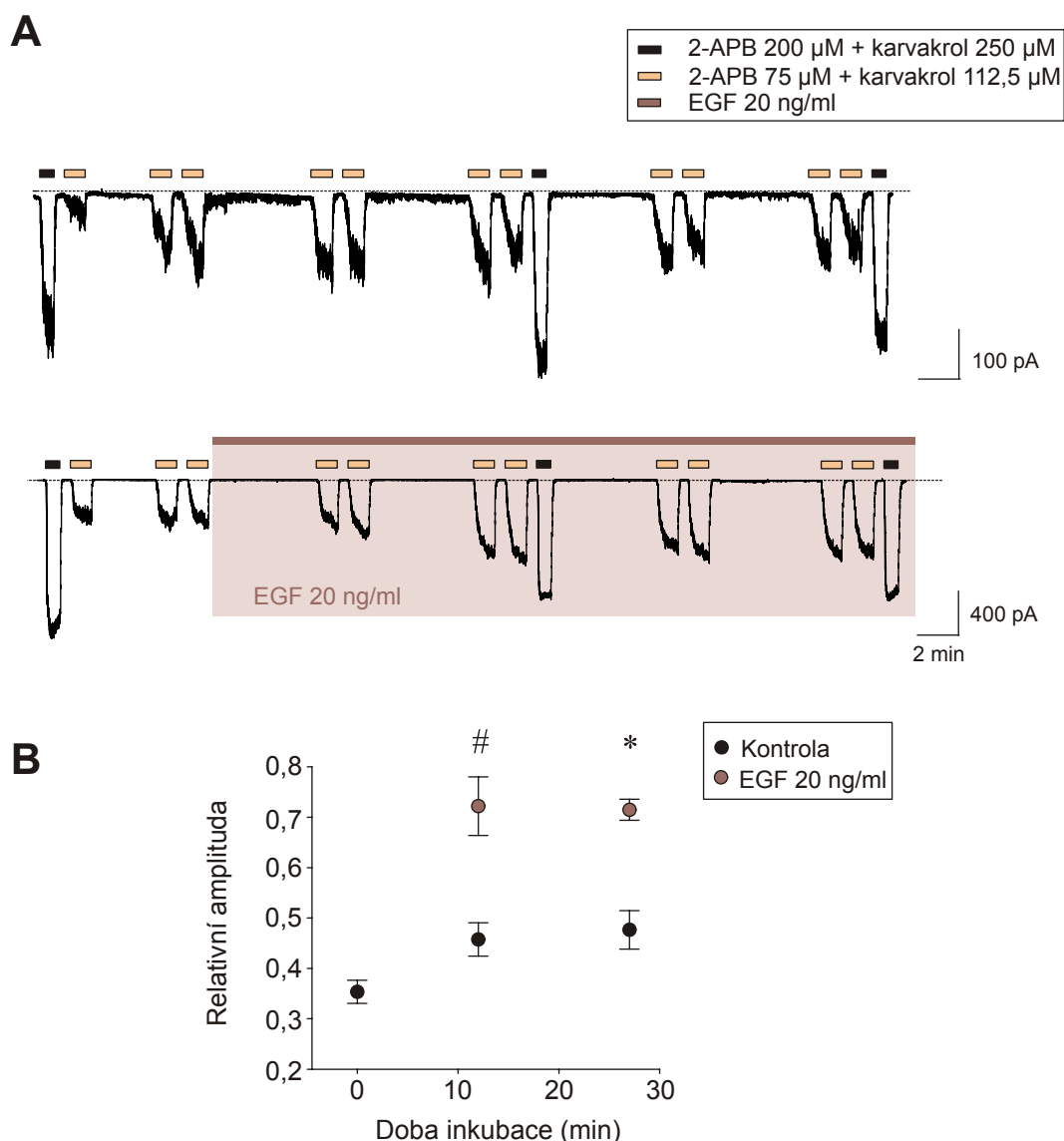
Endogenní exprese TRPV3 receptoru v HaCaT buňkách je výrazně nižší v porovnání s transfekovanými buňkami. Za účelem zvýšení amplitudy odpovědi jsme se rozhodli pokusy provádět v extracelulárním roztoku bez přidaných vápenatých iontů, které působí inhibičně na aktivitu TRPV3 receptoru (Xiao et al., 2008a) (Obrázek 4.16 B). Za těchto podmínek bylo možné u některých netransfekovaných HaCaT buněk pozorovat specifické odpovědi vyvolané chemickou stimulací, jejichž amplituda byla závislá na použité koncentraci agonistů TRPV3 receptoru (Obrázek 4.17A). Vodivost TRPV3 iontového kanálu je poměrně velká (asi 150 pS), což nám umožnilo pozorovat aktivitu jednotlivých kanálů i při měření sumárních proudů celé buňky (Obrázek 4.17B,C).



**Obrázek 4.17 Chemicky vyvolaná aktivace TRPV3 receptorů endogenně exprimovaných v HaCaT buňkách.** (A) Ukázka proudových odpovědí HaCaT buňky při stimulaci směsí agonistů TRPV3 receptoru (2-APB a karvakrol) aplikovaných v různých koncentracích. Použit byl extracelulární roztok, který neobsahoval vápenaté ionty. (B) Detail záznamu odpovědi vyvolané nízkou koncentrací agonistů (50  $\mu\text{M}$  2-APB s 75  $\mu\text{M}$  karvakrolu), kdy je možné pozorovat aktivitu jednotlivých TRPV3 iontových kanálů. (C) Detail záznamu deaktivční fáze odpovědi vyvolané saturační koncentrací agonistů (200  $\mu\text{M}$  2-APB s 250  $\mu\text{M}$  karvakrolu). Membránový potenciál -70 mV. Z – zavřený stav kanálu; O<sub>1</sub> – otevřen jeden iontový kanál; O<sub>2</sub> a O<sub>3</sub> – otevřeny současně 2 a 3 iontové kanály.

#### 4.2.2 Účinky EGF na aktivitu endogenních TRPV3 receptorů exprimovaných v HaCaT buňkách

Pro zhodnocení účinku epidermálního růstového faktoru na TRPV3 receptory jsme porovnávali velikosti proudových odpovědí buněk vyvolaných směsí agonistů před a v průběhu aplikace EGF (Obrázek 4.18). Již po dvanácti minutách inkubace v roztoku s 20 ng/ml EGF se průměrná amplituda odpovědi normalizovaných k velikosti maximální odpovědi zvýšila z  $0,35 \pm 0,02$  na  $0,72 \pm 0,06$  ( $n = 6$ ). K dalšímu zvýšení při delší inkubaci již nedošlo (Obrázek 4.18). V kontrolních podmínkách, kdy EGF nebyl přítomen, se relativní amplituda odpovědi při opakované stimulaci zvýšila na  $0,46 \pm 0,03$  ( $n = 5$ ), což je však signifikantně méně, než u buněk vystavených působení EGF. Z těchto výsledků vyplývá, že EGF způsobuje senzitivizaci TRPV3 receptoru již při krátkodobé stimulaci.



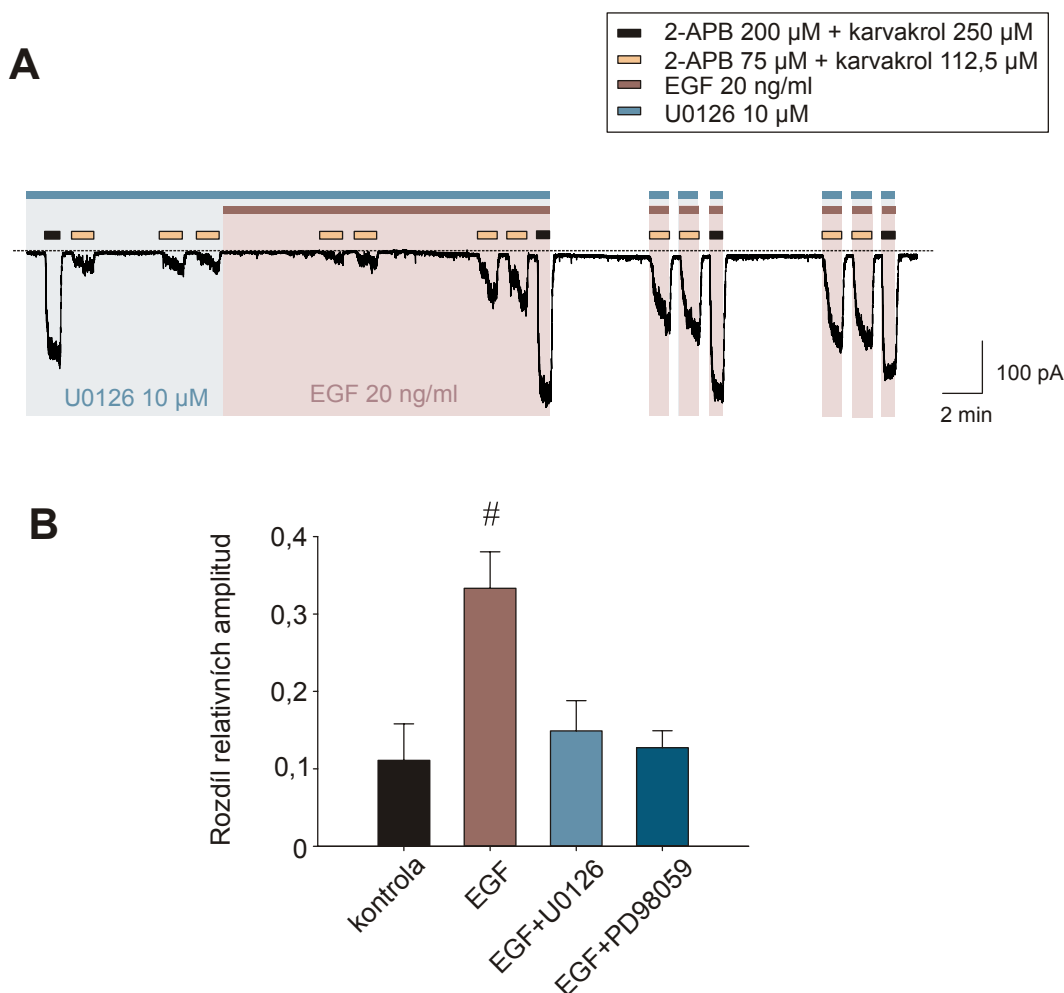
**Obrázek 4.18 EGF působí senzitivizačně na aktivitu TRPV3 receptorů.** (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí HaCaT buněk vyvolané chemickou stimulací v kontrolních podmínkách (horní záznam) a v přítomnosti EGF (spodní záznam). (B) Amplituda odpovědi vyvolaná aplikací 75 $\mu$ M 2-APB v kombinaci s 112,5 $\mu$ M karvakrolem normalizovaná vůči maximální odpovědi vyvolané saturační koncentrací agonistů (200  $\mu$ M 2-APB s 250  $\mu$ M karvakrolu) ( $n \geq 5$ ).

### 4.2.3 Mechanismus stimulačního působení EGF na aktivitu TRPV3 receptoru

Fyziologické účinky epidermálního růstového faktoru jsou zprostředkovány vazbou na specifický receptor spojený s tyrozinkinásovou aktivitou (EGFR) umístěný na membráně cílových buněk, jehož aktivace vede ke spuštění kaskády intracelulárních signalizačních dějů. Jednou z hlavních signalizačních drah napojených na EGFR je MAPK dráha, jejímž koncovým efektem je fosforylovaná ERK, která může ovlivňovat funkci velkého množství proteinů v buňce.



Abychom stanovili význam MAPK dráhy v senzitivaci TRPV3 receptoru vyvolané EGF, zopakovali jsme měření za podmínek, kdy byla tato dráha inhibována. Mezi známé inhibitory MAPK dráhy patří látky U0126 a PD98059 blokující funkci proteinů MEK1 a MEK2 (mitogeny aktivovaná proteinkináza kináza 1 a 2), jejichž hlavní úlohou je fosforylovat ERK. Při stimulaci HaCaT buněk pomocí EGF za současné aplikace 10  $\mu\text{M}$  U0126 nebo 30  $\mu\text{M}$  PD98059 nedošlo k signifikantní senzitivaci odpovědi vyvolaných směsí agonistů v porovnání s kontrolními podmínkami (Obrázek 4.19). Senzitivizační účinky epidermálního růstového faktoru tedy byly potlačeny inhibicí MAPK dráhy. U některých buněk bylo možné pozorovat zvýšení relativní velikosti odpovědi po pěti minutách od odstranění inhibitoru z extracelulárního prostoru (Obrázek 4.19A). Lze předpokládat, že odmytí inhibitoru umožnilo aktivaci MEK proteinů již nabuzenou signalizační kaskádou, účinek EGF se tudíž mohl opožděně projevit.



**Obrázek 4.19 Inhibice MAPK dráhy vede k potlačení senzitivizačního působení EGF.** (A) Ukázkový záznam proudových odpovědí HaCaT buňky při stimulaci EGF za současné aplikace inhibitoru U0126. (B) Rozdíl relativních amplitud vyvolaných aplikací 75  $\mu\text{M}$  2-APB s 112,5  $\mu\text{M}$  karvakrolu na začátku měření a po 12 minutách inkubace v přítomnosti EGF. K nárůstu velikosti odpovědi nedošlo při inkubaci buněk s inhibitory MAPK dráhy – U0126 (10  $\mu\text{M}$ ) či PD98059 (30  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 4-7$ ).

## 5 Diskuze

### 5.1 Mutační studie zaměřená na transmembránovou doménu TRPV1 receptoru

#### 5.1.1 Úloha S1 transmembránové oblasti

První část dizertační práce byla zaměřena na stanovení funkčního významu S1 transmembránové domény u TRPV1 receptorů. Úloha jednotlivých aminokyselin v dané oblasti byla zkoumána pomocí bodových záměn za tryptofan, vkládaných jednotlivě po celé délce S1 segmentu (rezidua V439 až R455). Důležitost aromatických reziduí jsme stanovili prostřednictvím substitucí za aminokyselinové zbytky bez aromatického kruhu. Šest ze sedmnácti námi připravených konstruktů se ukázalo být plně nefunkční – nebylo možné u nich vyvolat proudovou odpověď při stimulaci chemickými agonisty, depolarizací ani zvýšenou teplotou prostředí. Naše výsledky jsou v souladu s predikovanou topologií transmembránové domény TRPV1 receptoru (Adamian and Liang, 2006). Mutace, jež nezměnily funkci iontového kanálu, jsou na pozicích, u nichž bylo předpovězeno, že jsou nasměrovány do lipidického prostředí membrány. Naopak mutací zasažené pozice jsou ve zmíněném modelu skryty uvnitř proteinu. Výjimku tvoří fenylyalanin na pozici 439, jehož záměna za alanin vedla ke vzniku nefunkčního konstruktů, homologní pozice u lidského podtypu TRPV1 receptoru (L440) by však údajně měla směřovat do lipidické části membrány. Tento aminokyselinový zbytek se nalézá na předpokládané hranici mezi transmembránovým segmentem a intracelulární N-koncovou doménou a mohl by být důležitý pro správné zakotvení S1 do plazmatické membrány.

V intracelulární části S1 jsme nezaznamenali žádnou zřetelnou pravidelnost ve výskytu nefunkčních mutantů, naproti tomu v extracelulární části S1 segmentu se mutace výrazně postihující funkci TRPV1 receptoru vyskytují na každé třetí pozici (T449, A452, R455), což je periodičita charakteristická pro  $\alpha$ -helikální struktury (Obrázek 4.1, str. 42). Tato oblast transmembránové domény pravděpodobně slouží jako důležité interakční místo S1 s jinou částí iontového kanálu. Konzervativní mutace argininu na pozici 455 za lysin i alaninu 452 za valin vedla k silnému poškození funkčních

vlastností v různých aspektech aktivace TRPV1 receptoru, což poukazuje na klíčový význam dané oblasti ve vrátkování TRPV1 receptoru.

Možnost funkčně významné interakce R455 s blízkými záporně nabitými aminokyselinovými zbytky stejné podjednotky (E458 a E478) jsme vyvrátili pokusy na mutovaných iontových kanálech, u kterých byl negativní náboj odstraněn. E458K i E478A konstrukty se funkčně nijak nelišily od přirozené formy TRPV1, což vylučuje důležitou úlohu záporných nábojů na dané pozici.

U napětově ovládaných draslíkových kanálů ( $K_v$ ), které jsou strukturně vzdáleně příbuzné TRP receptorům, bylo v nedávné době poukázáno na klíčový význam interakce mezi extracelulární částí S1 a pórovým helixem sousední podjednotky (Lee et al., 2009). Autoři zmíněné práce předpokládají, že tento kontakt vytváří opěrný bod mezi napětovým senzorem (doména S1–S4) a pórovou doménou, který umožňuje účinnější transdukcii signálu od pohyblivého S4 segmentu, přes S4–S5 kličku až po vrátka  $K_v$  kanálů tvořených S6 transmembránovým úsekem. Analogická interakce S1 segmentu a pórové oblasti by se i u TRPV1 receptoru mohla podílet na mechanismu vrátkování. Tuto hypotézu podporují nejen výsledky naší mutační analýzy S1 segmentu, ale také skutečnost, že funkční projevy mutace R455K jsou velmi podobné projevům mutace treoninu v pórovém helixu za alanin (T633A). Oba konstrukty se vyznačovaly mírně zvýšenou klidovou aktivitou spojenou se zesílenou napětovou citlivostí. U R455K i T633A mutantů jsme zaznamenali poškození teplotní závislosti a zpomalení nástupu první odpovědi na kapsaicin. Po odmytí agonisty nedošlo k plné deaktivaci membránového proudu. Charakteristickou vlastností obou konstruktů je také necitlivost k aktivačním účinkům protonů. Již mírně snížené pH extracelulárního roztoku (pH 6,8) naopak vedlo ke snížení bazálního proudu i zbytkového membránového proudu po odmytí kapsaicinu.

V původní práci popisující důležitou úlohu T633 v citlivosti TRPV1 k protonům nebylo u T633A konstruktu prodloužení doby nástupu první odpovědi na kapsaicin pozorováno, ačkoli autoři zaznamenali podobný zpomalený fenotyp u chimérického iontového kanálu, u kterého byl celý pórový helix zaměněn za homologní sekvenci TRPV2 receptoru (Ryu et al., 2007). Rozpor s našimi výsledky může být zapříčiněn skutečností, že ve zmíněné práci byl jako templát použit konstrukt, kterému chyběla část pórové kličky předcházející selektivnímu filtru. U tohoto zkráceného TRPV1 konstruktu sice nebyly pozorovány funkční změny oproti přirozené formě iontového kanálu, přesto se však delece mohla projevit na aktivačních vlastnostech T633A mutantního receptoru.

### 5.1.2 Spontánní aktivita konstruktů s mutací v S1, S4/S4–S5 oblasti a pórovém helixu TRPV1 receptoru

Již v naší předchozí studii zaměřené na stanovení úlohy S4/S4–S5 oblasti v aktivačních vlastnostech vaniloidních TRP receptorů jsme zaznamenali zpomalení nástupu první kapsaicinové odpovědi, neúplnou deaktivaci po odmytí agonisty, posílení napěťové závislosti i zvýšenou bazální aktivitu u dvou konstruktů TRPV1 receptoru – R557K a G563S. Abychom porovnali fenotyp těchto mutací s R455K a T633A konstrukty, testovali jsme jejich citlivost k protonům. Snížení pH extracelulárního prostředí nevyvolalo u R557K a G563S konstruktů žádné zvýšení membránového proudu, naopak došlo k poklesu amplitudy bazálního proudu. Také velikost membránového proudu, který zůstal po odmytí kapsaicinu roztokem o standardním pH 7,3, byla mírným poklesem pH o více jak 50 % snížena. U R455K, R557K, G563S i T633A mutantních receptorů byly také postiženy proudové odpovědi vyvolané tepelnými stimuly. Z našich výsledků vyplývá, že mutace v navzájem vzdálených částech transmembránové domény TRPV1 receptoru, jako jsou extracelulární část S1 segmentu, S4/S4–S5 oblast a pórový helix, se na funkčních vlastnostech iontového kanálu projevují velmi podobným způsobem a narušují všechny aspekty polymodální aktivace TRPV1.

Je zajímavé, že se zmíněné mutace s podobnými fenotypovými projevy vyskytují v oblastech, které jsou u  $K_v$  iontových kanálů klíčové pro přenos aktivačního signálu z domény napěťového senzoru na pórovou doménu (Lee et al., 2009) (Obrázek 5.1, str. 72). Záměna na jiném místě – spojovací klíče mezi S3 a S4, která také specificky poškozuje pH citlivost (Ryu et al., 2007), se nijak neprojevila na odpovědích TRPV1 receptoru vyvolaných kapsaicinem, depolarizací ani zvýšenou teplotou. Tyto výsledky jsou tudíž v souladu s hypotézou, že by mechanismus vrátkování u TRPV1 a  $K_v$  iontových kanálů mohl být do určité míry společný.

Význam pórového helixu ve vrátkování TRPV1 receptoru byl prokázán také díky výsledkům studie zabývající se odhalováním mutací, které zvyšují aktivitu iontového kanálu (Myers et al., 2008). Byly popsány dva spontánně aktivní konstrukty s mutací v pravděpodobném místě ohybu mezi C-koncem pórového helixu a selektivním filtrem (rezidua 640 a 641), jež se vyznačovaly zvýšenou bazální aktivitou i chemickou citlivostí. F640L konstrukt sice bylo možné aktivovat silným okyselením extracelulárního prostoru, potenciační účinky lehce sníženého pH však byly odstraněny. Autoři zmíněné publikace se domnívají, že mutace F640L mimikuje konformaci TRPV1 iontového kanálu

charakteristickou pro protony vybuzený stav. Tento navržený mechanismus vzniku spontánní aktivity však není v souladu s některými charakteristickými rysy námi popsaných konstruktů se zvýšenou aktivitou. R455K, R557K, G563S či T633A konstrukty nebylo možné aktivovat ani silně sníženým pH extracelulárního prostředí (pH 5,5). Navíc jsme u těchto mutantních receptorů pozorovali zpomalení nástupu odpovědi na kapsaicin. TRPV1 iontový kanál vystavený potenciačnímu působení sníženého pH se naopak vyznačuje zkrácením doby nástupu kapsaicinových odpovědí (Neelands et al., 2005).

Potenciační účinky sníženého pH jsou pravděpodobně zprostředkovány vazbou protonů na glutamát v extracelulární kličce mezi pátým transmembránovým segmentem a pórovým helixem. TRPV1 konstrukt s mutací E600Q, jež mimikuje protonovaný stav daného rezidua, se vyznačuje zvýšenou klidovou aktivitou, která je dále posilována opakovanou aplikací agonisty. Oproti konstruktům popsaným v této dizertační práci však snížení pH extracelulárního prostředí nevedlo k inhibici bazálního proudu receptoru s mutací E600Q, naopak bylo schopné přímo kanál aktivovat (Jordt et al., 2000). Tato skutečnost nás dále utvrzuje v předpokladu, že vznik spontánní aktivity u R455K, R557K, G563S a T633A konstruktů nelze vysvětlit čistě poškozením aktivační dráhy protonů, ale je dán komplexnějšími mechanismy.

### **5.1.3 Mechanismus inhibičního působení protonů u spontánně aktivních TRPV1 konstruktů**

Inhibice aktivity vyvolaná zvýšením koncentrace protonů v prostředí je jedním z význačných rysů námi popsaných spontánně aktivních konstruktů. Je známo, že u přirozené formy TRPV1 receptoru vazba protonů na negativně nabitá rezidua v oblasti póru (E636 a D646) vede ke snížení vodivosti iontového kanálu, což se při měření z celé buňky projeví pouze zmenšením amplitudy membránového proudu vyvolaného poklesem pH (Liu et al., 2009). Snížení aktivity R455K, R557K, G563S a T633A konstruktů navozené protony však nelze výhradně přičíst blokujícím účinkům vodíkových iontů, neboť při následném zvýšení pH extracelulárního roztoku nedošlo k výraznému zvýšení amplitudy membránového proudu. Zdá se, že pokles pH spíše podněcuje stabilní změnu konformace mutantních TRPV1 receptorů, která přetrvává i po aplikaci roztoku s kontrolním pH. Tato domněnka je dále podporována skutečností, že u buněk

exprimujících spontánně aktivní iontové kanály, které již byly stimulovány kapsaicinem, je po aplikaci sníženého pH odpověď na kapsaicin opět výrazně zpomalena.

Abychom zjistili, zda je tato konformační změna vyvolána interakcí vodíkových iontů s pórovou oblastí, pokusili jsme se charakterizovat fenotyp spontánně aktivních konstruktů u nichž by byly E636 a D646 neutralizovány, čímž by byl napodoben protonovaný stav póru. Záměny E636Q a D646N snižují vodivost TRPV1 iontového kanálu, poškozují však i vrátkování (Welch et al., 2000). Jejich kombinace se záměnami navozujícími spontánní aktivitu vedla ke vzniku konstruktů se silně poškozenými funkčními vlastnostmi, které jsme nebyli schopni řádně analyzovat. Hypotézu, že je inhibiční působení sníženého pH u spontánně aktivních konstruktů zprostředkováno vazbou protonů do oblasti póru, tudíž nemůžeme našimi výsledky potvrdit ani vyvrátit.

Funkční charakterizací konstruktů s dvojitými záměnami R455K/E600A a R455K/E648A jsme prokázali, že přinejmenším u R455K mutantního receptoru není inhibiční účinek protonů závislý na přítomnosti extracelulárních sensorů sníženého pH. Neutralizace záporně nabitých aminokyselinových zbytků E600 a E648, jejichž protonace stimuluje aktivitu přirozené formy TRPV1 receptoru (Jordt et al., 2000), nevedla k oslabení inhibičního účinku zvýšené koncentrace protonů v prostředí. Pro odhalení mechanismu, jakým protony stabilizují zavřený stav spontánně aktivních TRPV1 receptorů, tedy bude potřeba provést další sérii experimentů.

#### **5.1.4 Hystereze vrátkování u mutantních a přirozených forem TRPV1 iontových kanálů**

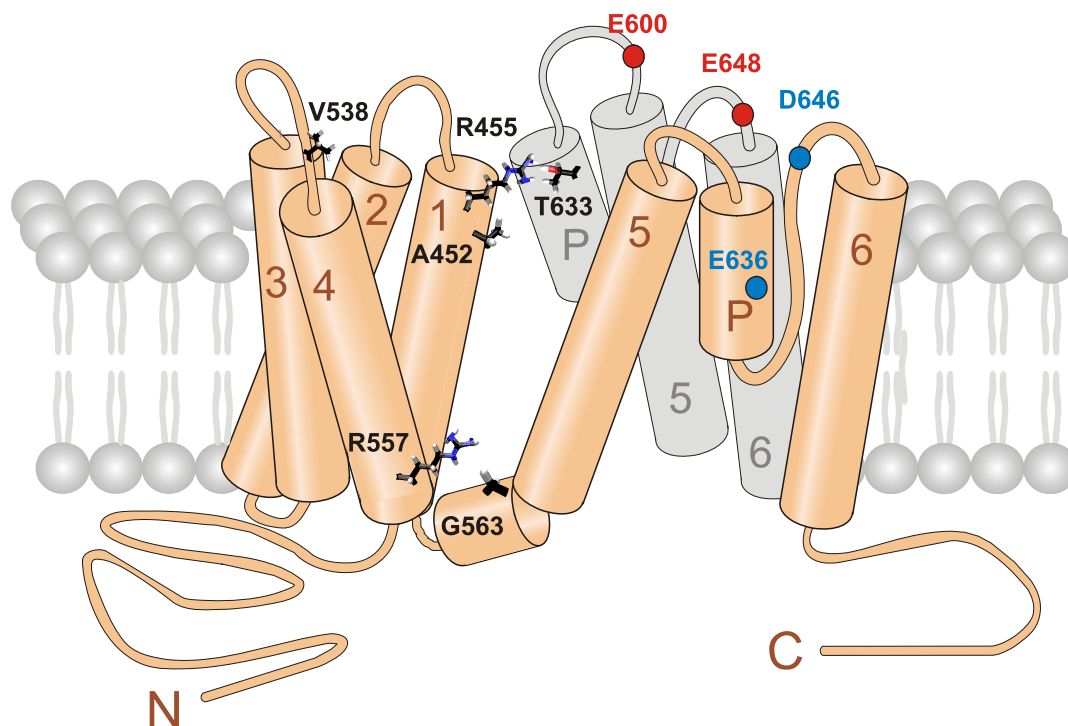
U námi popsaných konstruktů se zvýšenou aktivitou, ale i u některých TRPV1 receptorů s mutovanými alaninovými zbytky v extracelulární části S1, jsme pozorovali zpomalení nástupu odpovědi při první aplikaci kapsaicinu. Rychlost nástupu odpovědi při druhé stimulaci kapsaicinem již byla u zmíněných mutantů srovnatelná či dokonce vyšší než u přirozené formy TRPV1. Skutečnost, že fenotyp většiny konstruktů s prodlouženým nástupem první kapsaicinové odpovědi je charakterizován také pomalejší deaktivací při odmývání agonisty, naznačuje, že vazba kapsaicinu způsobuje destabilizaci zavřeného stavu iontového kanálu, která přetrvává i po odstranění agonisty. Tato konformační změna se u spontánně aktivních konstruktů v S1, S4–S4/S5 a u T633A konstruktů projevuje také výrazným zvýšením klidového proudu po odmytí kapsaicinu.

Konzervativní záměna alaninu 452, umístěného na třetí pozici před R455 v S1 segmentu, za valin, se vyznačovala nižší citlivostí iontového kanálu ke kapsaicinu. Koncentrace agonisty, která je pro přirozenou formu TRPV1 receptoru téměř saturační (Kaps 1), vyvolala u A452V konstruktů mnohem nižší odpověď než aplikace o řád vyšší koncentrace kapsaicinu (Kaps 10). Stimulace vyšší koncentrací agonisty však následně vedla ke zvýšení citlivosti iontového kanálu, což se projevilo více jak desetinásobným zvýšením amplitudy odpovědi vyvolané Kaps 1. Citlivost ke sníženému pH však tímto ovlivněna nebyla.

Z našich výsledků vyplývá, že vrátkovací vlastnosti i citlivost ke kapsaicinu TRPV1 konstruktů s mutací v extracelulární části S1 segmentu, S4–S4/S5 oblasti a pórovém helixu, jsou ovlivňovány předchozí aktivační historií. Zdá se, že mutantní receptory mohou existovat ve dvou antagonistických stavech, kdy je zavřená konformace iontového kanálu buď stabilizována či destabilizována. Přechod mezi oběma stavy je stimulován aplikací sníženého pH (stabilizace zavřeného stavu) nebo kapsaicinem (destabilizace zavřeného stavu). Otázkou je, zda jsou tyto konformační změny důsledkem aminokyselinových záměn, či zda poškození vrátkovacích vlastností způsobené mutacemi umožňuje lépe tyto funkční přechody pozorovat. Druhá možnost je podporována skutečností, že i u přirozené formy TRPV1 iontového kanálu za podmínek, kdy nejsou v extracelulárním prostředí přítomny vápenaté ionty, je pomalá komponenta nástupu odpovědi na kapsaicin větší mírou zastoupena při první aplikaci agonisty. Při druhé stimulaci kapsaicinem se pomalá komponenta podílí na odpovědi již jen minimálně. Zpomalení nástupu odpovědi na kapsaicin u přirozené formy TRPV1 bylo zřetelně patrné tehdy, když vlastní aplikaci kapsaicinu předcházela stimulace roztokem o silně kyselém pH (pH 4,0). Tyto desenzitizační účinky protonů nebyly doposud nikde popsány ani vysvětleny.

Konformační změny TRPV1 iontového kanálu závislé na koncentraci kapsaicinu a délce jeho aplikace byly diskutovány již dříve. Při déletrvající stimulaci kapsaicinem dochází u TRPV1 receptoru ke změnám v relativní propustnosti pro monovalentní a divalentní ionty, což je interpretováno jako projev postupné dilatace póru. Bylo prokázáno, že změny v propustnosti jsou provázány konformační změnou selektivního filtru (Chung et al., 2008). Mutace v pórové oblasti také ovlivňují citlivost TRPV1 receptoru ke kapsaicinu, i když se tato část iontového kanálu na vazbě kapsaicinu nepodílí (Welch et al., 2000). Hystereze vrátkování u konstruktů s mutací v extracelulární části S1 transmembránového segmentu, R557K, G563S i T633A mutantních receptorů by

tudíž mohla odrážet dynamické změny ve struktuře pórové oblasti. Tato hypotéza je podporována umístěním mutací zmíněných konstruktů, které poukazuje na jejich možnou důležitou úlohu při přenosu signálu z periferní domény iontového kanálu na pórovou doménu (Obrázek 5.1).



**Obrázek 5.1** Schematická struktura podjednotky TRPV1 receptoru se zobrazenými postranními řetězci aminokyselin, jejichž mutace vede k postižení citlivosti TRPV1 receptoru ke sníženému pH. Dle naší hypotézy by funkční význam R455 a A452 reziduí mohl spočívat v interakci extracelulární části S1 s pórovým helixem sousední podjednotky. Barevně jsou vyznačena předpokládaná vazebná místa pro vodíkové ionty – červeně jsou zobrazena rezidua, jejichž protonace vede k aktivaci (E648) či potenciaci (E600) TRPV1 receptoru; modře jsou znázorněny aminokyselinové zbytky zodpovídající za blokuující účinky protonů (E636 a D646).

## 5.2 Aktivace a modulace endogenních TRPV3 receptorů exprimovaných v keratinocytech

Druhá část mé dizertační práce byla zaměřena na stanovení akutního účinku epidermálního růstového faktoru na aktivitu TRPV3 receptorů. Pokusy jsme prováděli na buňkách linie imortalizovaných lidských keratinocytů HaCaT. Tyto buňky mají zachovány specifické vlastnosti keratinocytů včetně exprese TRPV3 iontových kanálů na buněčné membráně (Boukamp et al., 1988; Sherkheli et al., 2009). Našimi experimenty jsme prokázali, že již při krátkodobé stimulaci HaCaT buněk pomocí EGF dochází k výraznému zvýšení citlivosti TRPV3 receptorů. Pozorovaný účinek EGF byl



odstraněn, pokud byly buňky inkubovány v roztoku obsahujícím inhibitory MAPK dráhy, jež je jednou z hlavních signalizačních drah napojenou na EGF receptor.

Pro stanovení přesného mechanismu, jakým aktivace MAPK dráhy vede k senzitivaci TRPV3 receptorů, bude potřeba provést další experimenty. Jedním z možných způsobů je průkaz přímé fosforylace TRPV3 receptoru ERK kinázou, mezi jejíž substráty se řadí i některé iontové kanály (Schrader et al., 2006; Stamboulian et al., 2010). Například aktivita TRPC6 receptorů, iontových kanálů z podrodiny kanonických TRP receptorů, je regulována ERK kinázou, která pravděpodobně fosforyluje specifický serinový zbytek na N-konci iontového kanálu (Shen et al., 2011). Mutace tohoto fosforylačního místa či inhibice MAPK dráhy zabraňuje aktivaci TRPC6 receptorů v reakci na zvýšení intracelulární koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Na N- i C-konci TRPV3 receptoru se vyskytuje několik serinových a treoninových zbytků, jež by potenciálně mohly být ERK kinázou fosforylovány. ERK by tudíž mohla spolu s PLC regulovat citlivost TRPV3 iontových kanálů k aktivačním stimulům.

Nedávno byla popsána důležitá úloha TRPV3 receptoru v signalizační dráze EGF a TGF- $\alpha$ , která má zásadní význam pro správnou funkci buněk pokožky (Cheng et al., 2010). Klíčový význam TRPV3 receptoru v signalizaci růstových faktorů je podpořen také skutečností, že myši s vyřazeným funkčním genem pro TRPV3 i TGF- $\alpha$  se vyznačují nápadně podobnou morfologií srsti. Chlupové folikuly *Trpv3* i *Tgf- $\alpha$*  KO zvířat jsou méně uspořádány v porovnání s kontrolními zvířaty a jejich chlupy i vousy jsou pokroucené (Luetkeke et al., 1993; Cheng et al., 2010). Stejné fenotypické vlastnosti lze pozorovat také u myši s postiženou funkcí EGF/TGF- $\alpha$  receptoru (EGFR) (Luetkeke et al., 1994). Naše výsledky přispívají k objasnění, jakými mechanismy jsou EGFR a TRPV3 iontový kanál funkčně propojeny.

## 6 Závěr

### 6.1 Závěry mutační studie zaměřené na TRPV1 iontový kanál

- Mutačními pokusy jsme prokázali, že extracelulární část S1 segmentu TRPV1 receptoru zastává významnou úlohu ve vrátkování iontového kanálu. Pro činnost TRPV1 iontového kanálu je klíčová přítomnost kladně nabitého rezidua na pozici 455.
- Fenotyp TRPV1 receptorů s mutací R455K v extracelulární části S1 a T633A v pórovém helixu je podobný fenotypu spontánně aktivních mutantů se záměnou v S4/S4–S5 oblasti (R557K a G563S konstrukty). Všechny zmíněné mutace narušují rovnováhu mezi otevřeným a zavřeným stavem iontového kanálu. Zavřený stav R455K, T633A, R557K i G563S konstruktů je stabilizován snížením pH extracelulárního prostředí. Pozorované inhibiční působení zvýšené koncentrace protonů není závislé na přítomnosti extracelulárních pH senzorů TRPV1 receptoru – glutamátů na pozicích 600 a 648.
- Protony stabilizují zavřený stav iontového kanálu i u přirozené formy TRPV1 receptoru, což doposud nebylo nikde popsáno. Domníváme se, že u přirozené formy TRPV1 i mutantních receptorů je mechanismus inhibičního působení sníženého pH shodný. U konstruktů se zvýšenou aktivitou jsou však desenzitizační účinky protonů lépe pozorovatelné, neboť je jejich citlivost k aktivačním účinkům sníženého pH odstraněna.

## **6.2 Závěry studie zaměřené na modulační mechanizmy TRPV3 receptorů**

- Krátkodobá stimulace HaCaT buněk epidermálním růstovým faktorem (EGF) vede k senzitivizaci endogenních TRPV3 receptorů. Působení 20 ng/ml EGF po dvanácti minutách inkubace zvyšuje relativní průměrnou amplitudu odpovědí zprostředkovaných TRPV3 receptorem na dvojnásobek.
- Modulační působení EGF je závislé na aktivitě MAPK dráhy. Senzitivizace odpovědí zprostředkovaných TRPV3 receptorem EGF je blokována inhibitory MAPK dráhy, U0126 a PD98059, látkami blokujícími funkci proteinů MEK1 a MEK2, jejichž hlavní úlohou je fosforylovat ERK.

## 7 Seznam publikací

### Impaktované publikace

- Boukalova S, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V  
Conserved residues within the putative S4–S5 region serve distinct functions among thermosensitive vanilloid transient receptor potential (TRPV) channels  
*Journal of Biological Chemistry*, **285(53)**, 41455-41462, 2010  
IF = 5,328 (2010)
- Boukalova S, Teisinger J, Vlachova V  
Protons stabilize the closed conformation of gain-of-function mutants of the TRPV1 channel.  
*BBA – Molecular Cell Research*, **1833(3)**, 520-528, 2013  
IF = 4,808 (2012)
- Vetter I, Hein A, Sattler S, Hessler S, Touska F, Bressan E, Parra A, Hager U, Leffler A, Boukalova S, Nissen M, Lewis R, Belmonte C, Alzheimer C, Huth T, Vlachova V, Reeh PW, Zimmermann K  
Amplification of cold transduction in native nociceptors by M-channel inhibition  
*Journal of Neuroscience (přijato do tisku)*  
IF = 6,908 (2012)
- Boukalova S, Touska F, Marsakova L, Hynkova A, Sura L, Chvojka S, Dittert I, Vlachova V  
Gain-of-function mutations in the transient receptor potential channels TRPV1 and TRPA1: How painful?  
*Physiological Research (v recenzním řízení)*  
IF = 1,531 (2012)

### Neimpaktované publikace

- Boukalová Š, Vlachová V  
TRP receptory jako transdukční molekuly nociceptivních podnětů  
*Bolest*, **11(4)**, 194-206, 2008

## 8 Citovaná literatura

1. Adamian L., Liang J. (2006) Prediction of transmembrane helix orientation in polytopic membrane proteins. *BMC Struct Biol* 6: 13.
2. Anand P., Bley K. (2011) Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* 107: 490-502.
3. Aneiros E., Cao L., Papakosta M., Stevens E.B., Phillips S., Grimm C. (2011) The biophysical and molecular basis of TRPV1 proton gating. *Embo J* 30: 994-1002.
4. Asakawa M., Yoshioka T., Hikita I., Matsutani T., Hirasawa T., Arimura A., Sakata T., Horikawa T. (2005) WBN/Kob-Ht rats spontaneously develop dermatitis under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. *Exp Anim* 54: 461-465.
5. 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.
6. Bang S., Yoo S., Yang T.J., Cho H., Hwang S.W. (2010) Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3. *J Biol Chem* 285(25):19362-71
7. Baumann T.K., Martenson M.E. (2000) Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin- gated channels. *J Neurosci* 20: RC80.
8. Binshtok A.M., Bean B.P., Woolf C.J. (2007) Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 449: 607-610.
9. Bohlen C.J., Priel A., Zhou S., King D., Siemens J., Julius D. (2010) A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell* 141: 834-845.
10. Borbiri I., Lisztes E., Toth B.I., Czifra G., Olah A., Szollosi A.G., Szentandrassy N., Nanasi P.P., Peter Z., Paus R., Kovacs L., Biro T. (2011) Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *J Invest Dermatol* 131: 1605-1614.
11. Boukalova S., Marsakova L., Teisinger J., Vlachova V. (2010) Conserved Residues within the Putative S4-S5 Region Serve Distinct Functions among Thermosensitive Vanilloid Transient Receptor Potential (TRPV) Channels. *J Biol Chem* 285: 41455-41462.

12. Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771.
13. Brandt M.R., Beyer C.E., Stahl S.M. (2012) TRPV1 Antagonists and Chronic Pain: Beyond Thermal Perception. *Pharmaceuticals* 5: 114-132.
14. 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.
15. 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.
16. Cao E., Cordero-Morales J.F., Liu B., Qin F., Julius D. (2013) TRPV1 Channels Are Intrinsically Heat Sensitive and Negatively Regulated by Phosphoinositide Lipids. *Neuron* 77: 667-679.
17. 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.
18. Clapham D.E., Miller C. (2011) A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19492-19497.
19. Cosens D.J., Manning A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224: 285-287.
20. Cui Y., Yang F., Cao X., Yarov-Yarovoy V., Wang K., Zheng J. (2012) Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J Gen Physiol* 139: 273-283.
21. 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.
22. DeCoursey T.E. (2013) Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family. *Physiol Rev* 93: 599-652.
23. Derry S., Moore R.A. (2012) Topical capsaicin (low concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 9: CD010111.
24. Derry S., Sven-Rice A., Cole P., Tan T., Moore R.A. (2013) Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD007393.

25. 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.
26. 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.
27. Doerner J.F., Hatt H., Ramsey I.S. (2011) Voltage- and temperature-dependent activation of TRPV3 channels is potentiated by receptor-mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis. *J Gen Physiol* 137: 271-288.
28. Frazier D.T., Narahashi T., Yamada M. (1970) The site of action and active form of local anesthetics. II. Experiments with quaternary compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 171: 45-51.
29. Garcia-Martinez C., Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., Merino J.M., Ferrer-Montiel A. (2000) Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem* 275: 32552-32558.
30. 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.
31. 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.
32. Gavva N.R., Bannon A.W., Surapaneni S., Hovland D.N., Jr., Lehto S.G., Gore A., Juan T., Deng H., Han B., Klionsky L., Kuang R., Le A., Tamir R., Wang J., Youngblood B., Zhu D., Norman M.H., Magal E., Treanor J.J., Louis J.C. (2007) The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* 27: 3366-3374.
33. Grandl J., Kim S.E., Uzzell V., Bursulaya B., Petrus M., Bandell M., Patapoutian A. (2010) Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nat Neurosci* 13: 708-714.
34. Grycova L., Holendova B., Bumba L., Bily J., Jirku M., Lansky Z., Teisinger J. (2012) Integrative binding sites within intracellular termini of TRPV1 receptor. *PLoS One* 7: e48437.
35. Gunthorpe M.J., Smith G.D., Davis J.B., Randall A.D. (2001) Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch* 442: 668-674.
36. Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

37. Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90: 291-366.
38. Hikita I., Yoshioka T., Mizoguchi T., Tsukahara K., Tsuru K., Nagai H., Hirasawa T., Tsuruta Y., Suzuki R., Ichihashi M., Horikawa T. (2002) Characterization of dermatitis arising spontaneously in DS-Nh mice maintained under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 30: 142-153.
39. 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.
40. Hu H.Z., Xiao R., Wang C., Gao N., Colton C.K., Wood J.D., Zhu M.X. (2006) Potentiation of TRPV3 channel function by unsaturated fatty acids. *J Cell Physiol* 208: 201-212.
41. Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J., Miller J.D., Davies S.N., Geppetti P., Walker J.M., Di Marzo V. (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8400-8405.
42. Huang S.M., Lee H., Chung M.K., Park U., Yu Y.Y., Bradshaw H.B., Coulombe P.A., Walker J.M., Caterina M.J. (2008) Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2. *J Neurosci* 28: 13727-13737.
43. Huang S.M., Li X., Yu Y., Wang J., Caterina M.J. (2011) TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* 7: 37.
44. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33-38.
45. 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.
46. Cheng X., Jin J., Hu L., Shen D., Dong X.P., Samie M.A., Knoff J., Eisinger B., Liu M.L., Huang S.M., Caterina M.J., Dempsey P., Michael L.E., Dlugosz A.A., Andrews N.C., Clapham D.E., Xu H. (2010) TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 141: 331-343.
47. 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.



48. Chung M.K., Lee H., Mizuno A., Suzuki M., Caterina M.J. (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24: 5177-5182.
49. Chung M.K., Guler A.D., Caterina M.J. (2005) Biphasic currents evoked by chemical or thermal activation of the heat-gated ion channel, TRPV3. *J Biol Chem* 280: 15928-15941.
50. Chung M.K., Guler A.D., Caterina M.J. (2008) TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11: 555-564.
51. Johnson D.M., Garrett E.M., Rutter R., Bonnert T.P., Gao Y.D., Middleton R.E., Sutton K.G. (2006) Functional mapping of the transient receptor potential vanilloid 1 intracellular binding site. *Mol Pharmacol* 70: 1005-1012.
52. 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.
53. Jordt S.E., Julius D. (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108: 421-430.
54. Kanizsai P., Garami A., Solymer M., Szolcsanyi J., Szelenyi Z. (2009) Energetics of fasting heterothermia in TRPV1-KO and wild type mice. *Physiol Behav* 96: 149-154.
55. Kim S.E., Patapoutian A., Grandl J. (2013) Single residues in the outer pore of TRPV1 and TRPV3 have temperature-dependent conformations. *PLoS One* 8: e59593.
56. Klein R.M., Ufret-Vincenty C.A., Hua L., Gordon S.E. (2008) Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J Biol Chem* 283: 26208-26216.
57. 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.
58. Kwak J., Wang M.H., Hwang S.W., Kim T.Y., Lee S.Y., Oh U. (2000) Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J Neurosci* 20: 8298-8304.
59. Kyung K.H. (2012) Antimicrobial properties of allium species. *Curr Opin Biotechnol* 23: 142-147.
60. Lau S.Y., Procko E., Gaudet R. (2012) Distinct properties of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *J Gen Physiol* 140: 541-555.

61. Lee S.Y., Banerjee A., MacKinnon R. (2009) Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS Biol* 7: e47.
62. Lehto S.G., Tamir R., Deng H., Klionsky L., Kuang R., Le A., Lee D., Louis J.C., Magal E., Manning B.H., Rubino J., Surapaneni S., Tamayo N., Wang T., Wang J., Wang J., Wang W., Youngblood B., Zhang M., Zhu D., Norman M.H., Gavva N.R. (2008) Antihyperalgesic effects of (R,E)-N-(2-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)-3-(2-(piperidin-1-yl)-4-(tri fluoromethyl)phenyl)-acrylamide (AMG8562), a novel transient receptor potential vanilloid type 1 modulator that does not cause hyperthermia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 218-229.
63. Leung Y.M. (2012) Involvement of C-type inactivation gating in the actions of voltage-gated K<sup>+</sup> channel inhibitors. *Pharmacol Ther* 133: 151-158.
64. Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74: 49-139.
65. 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.
66. Liu B., Yao J., Wang Y., Li H., Qin F. (2009) Proton inhibition of unitary currents of vanilloid receptors. *J Gen Physiol* 134: 243-258.
67. Liu B., Yao J., Zhu M.X., Qin F. (2011) Hysteresis of gating underlines sensitization of TRPV3 channels. *J Gen Physiol* 138: 509-520.
68. Luetkeke N.C., Qiu T.H., Peiffer R.L., Oliver P., Smithies O., Lee D.C. (1993) TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 73: 263-278.
69. Luetkeke N.C., Phillips H.K., Qiu T.H., Copeland N.G., Earp H.S., Jenkins N.A., Lee D.C. (1994) The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev* 8: 399-413.
70. Macpherson L.J., Geierstanger B.H., Viswanath V., Bandell M., Eid S.R., Hwang S., Patapoutian A. (2005) The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* 15: 929-934.
71. 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.
72. Mann G.B., Fowler K.J., Gabriel A., Nice E.C., Williams R.L., Dunn A.R. (1993) Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 73: 249-261.

73. Mason L., Moore R.A., Derry S., Edwards J.E., McQuay H.J. (2004) Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *Bmj* 328: 991.
74. Miyamoto T., Petrus M.J., Dubin A.E., Patapoutian A. (2011) TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat Commun* 2: 369.
75. 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.
76. Montell C., Rubin G.M. (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-1323.
77. 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.
78. Murata Y., Iwasaki H., Sasaki M., Inaba K., Okamura Y. (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435: 1239-1243.
79. Murata Y., Okamura Y. (2007) Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP2. *J Physiol* 583: 875-889.
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. Neelands T.R., Jarvis M.F., Han P., Faltynek C.R., Surowy C.S. (2005) Acidification of rat TRPV1 alters the kinetics of capsaicin responses. *Mol Pain* 1: 28.
82. Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87: 165-217.
83. Owsianik G., Talavera K., Voets T., Nilius B. (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68: 685-717.
84. 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. (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296: 2046-2049.
85. 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.

86. Planells-Cases R., Garcia-Sanz N., Morenilla-Palao C., Ferrer-Montiel A. (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch* 451: 151-159.
87. Prescott E.D., Julius D. (2003) A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300: 1284-1288.
88. Ragsdale D.S., McPhee J.C., Scheuer T., Catterall W.A. (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9270-9275.
89. Reilly R.M., McDonald H.A., Puttfarcken P.S., Joshi S.K., Lewis L., Pai M., Franklin P.H., Segreti J.A., Neelands T.R., Han P., Chen J., Mantyh P.W., Ghilardi J.R., Turner T.M., Voight E.A., Daanen J.F., Schmidt R.G., Gomtsyan A., Kort M.E., Faltynek C.R., Kym P.R. (2012) Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonists that do not alter body temperature. *J Pharmacol Exp Ther* 342: 416-428.
90. Rohacs T., Thyagarajan B., Lukacs V. (2008) Phospholipase C mediated modulation of TRPV1 channels. *Mol Neurobiol* 37: 153-163.
91. Romanovsky A.A., Almeida M.C., Garami A., Steiner A.A., Norman M.H., Morrison S.F., Nakamura K., Burmeister J.J., Nucci T.B. (2009) The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev* 61: 228-261.
92. Rosenbaum T., Gordon-Shaag A., Munari M., Gordon S.E. (2004) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123: 53-62.
93. Ryu S., Liu B., Yao J., Fu Q., Qin F. (2007) Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci* 27: 12797-12807.
94. Salazar H., Llorente I., Jara-Oseguera A., Garcia-Villegas R., Munari M., Gordon S.E., Islas L.D., Rosenbaum T. (2008) A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat Neurosci* 11: 255-261.
95. 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* 16: 704-710
96. Shen B., Kwan H.Y., Ma X., Wong C.O., Du J., Huang Y., Yao X. (2011) cAMP activates TRPC6 channels via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB)-mitogen-activated protein kinase (MEK)-ERK1/2 signaling pathway. *J Biol Chem* 286: 19439-19445.

97. Sherkheli M.A., Benecke H., Doerner J.F., Kletke O., Vogt-Eisele A.K., Gisselmann G., Hatt H. (2009) Monoterpenoids induce agonist-specific desensitization of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) ion channels. *J Pharm Pharm Sci* 12: 116-128.
98. Schneider M.R., Werner S., Paus R., Wolf E. (2008) Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am J Pathol* 173: 14-24.
99. Schrader L.A., Birnbaum S.G., Nadin B.M., Ren Y., Bui D., Anderson A.E., Sweatt J.D. (2006) ERK/MAPK regulates the Kv4.2 potassium channel by direct phosphorylation of the pore-forming subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C852-861.
100. Siemens J., Zhou S., Piskorowski R., Nikai T., Lumpkin E.A., Basbaum A.I., King D., Julius D. (2006) Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444: 208-212.
101. Smith G.D., Gunthorpe M.J., Kelsell R.E., Hayes P.D., Reilly P., Facer P., Wright J.E., Jerman J.C., Walhin J.P., Ooi L., Egerton J., Charles K.J., Smart D., Randall A.D., Anand P., Davis J.B. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418: 186-190.
102. Stamboulian S., Choi J.S., Ahn H.S., Chang Y.W., Tyrrell L., Black J.A., Waxman S.G., Dib-Hajj S.D. (2010) ERK1/2 mitogen-activated protein kinase phosphorylates sodium channel Na(v)1.7 and alters its gating properties. *J Neurosci* 30: 1637-1647.
103. Steiner A.A., Turek V.F., Almeida M.C., Burmeister J.J., Oliveira D.L., Roberts J.L., Bannon A.W., Norman M.H., Louis J.C., Treanor J.J., Gavva N.R., Romanovsky A.A. (2007) Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* 27: 7459-7468.
104. Stock L., Souza C., Treptow W. (2013) Structural basis for activation of voltage-gated cation channels. *Biochemistry* 52: 1501-1513.
105. Sutton K.G., Garrett E.M., Rutter A.R., Bonnert T.P., Jarolimek W., Seabrook G.R. (2005) Functional characterisation of the S512Y mutant vanilloid human TRPV1 receptor. *Br J Pharmacol* 146: 702-711.
106. 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.
107. Touska F., Marsakova L., Teisinger J., Vlachova V. (2011) A "cute" desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol* 12: 122-129.

108. Ufret-Vincenty C.A., Klein R.M., Hua L., Angueyra J., Gordon S.E. (2011) Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels. *J Biol Chem* 286: 9688-9698.
109. 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 1. *Faseb J* 22: 3298-3309.
110. Vlachova V., Teisinger J., Susankova K., Lyfenko A., Ettrich R., Vyklicky L. (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 23: 1340-1350.
111. Watabiki T., Kiso T., Kuramochi T., Yonezawa K., Tsuji N., Kohara A., Kakimoto S., Aoki T., Matsuoka N. (2011) Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in rats without hyperthermic effect. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 743-750.
112. Welch J.M., Simon S.A., Reinhart P.H. (2000) The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13889-13894.
113. Wong G.Y., Gavva N.R. (2009) Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev* 60:267-277.
114. Wu Z., Yang Q., Crook R.J., O'Neil R.G., Walters E.T. (2013) TRPV1 Channels Make Major Contributions to Behavioral Hypersensitivity and Spontaneous Activity in Nociceptors After Spinal Cord Injury. *Pain* doi:10.1016/j.pain.2013.06.040
115. Xiao R., Tang J., Wang C., Colton C.K., Tian J., Zhu M.X. (2008a) Calcium Plays a Central Role in the Sensitization of TRPV3 Channel to Repetitive Stimulations. *J Biol Chem* 283: 6162-6174.
116. 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.
117. 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.
118. 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.

119. 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.
120. Yao J., Qin F. (2009) Interaction with phosphoinositides confers adaptation onto the TRPV1 pain receptor. *PLoS Biol* 7: e46.
121. Yao J., Liu B., Qin F. (2011) Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11109-11114.
122. Yoshioka T., Imura K., Asakawa M., Suzuki M., Oshima I., Hirasawa T., Sakata T., Horikawa T., Arimura A. (2009) Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice. *J Invest Dermatol* 129: 714-722.
123. Zhang F., Liu S., Yang F., Zheng J., Wang K. (2011) Identification of a tetrameric assembly domain in the C terminus of heat-activated TRPV1 channels. *J Biol Chem* 286: 15308-15316.
124. Zhang X., Li L., McNaughton P.A. (2008) Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* 59: 450-461.
125. Zygmunt P.M., Petersson J., Andersson D.A., Chuang H., Sorgard M., Di Marzo V., Julius D., Hogestatt E.D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457.