

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát dizertační práce

Mechanismy aktivace a modulace vaniloidních TRP receptorů

Mechanisms of activation and modulation of vanilloid TRP channels

Štěpána Boukalová

Praha, 2013

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program:	Fyziologie živočichů
Předseda oborové rady:	Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.
Školící pracoviště:	Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. Oddělení buněčné neurofyziologie
Autor:	Mgr. Štěpána Boukalová
Školitel:	RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

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

OBSAH/CONTENT

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	6
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metodika	7
4. Výsledky	9
5. Diskuze	18
6. Závěry	22
1. Introduction	23
2. Aims of the study	24
3. Materials and methods	24
4. Results	25
5. Discussion	36
6. Conclusions	39
7. Použitá literatura/References	40
8. Seznam publikací/Selected publications	42
9. Curriculum vitae	43

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 extracelulárním 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 zaměřena na stanovení účinku epidermálního růstového faktoru (EGF) na aktivitu TRPV3 receptorů endogenně exprimovaných v linii immortalizovaných 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 protein kináza) 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 Úvod

TRP („transient receptor potential“) receptory jsou iontové kanály propustné pro kationty, které zastávají důležitou funkční úlohu u živočichů. Řada z nich se účastní transdukce senzoričtých stimulů a zprostředkovává tak vnímání světelných, chemických i mechanických podnětů působících na organismus (Damann et al., 2008). V nedávné době bylo objeveno několik TRP iontových kanálů, jež specificky reagují na změnu teploty prostředí. Tyto takzvané teplocitlivé TRP receptory, mezi které patří i TRPV1 a TRPV3 iontové kanály, jsou charakteristické tím, že mohou být aktivovány nejen tepelnými, ale také mechanickými podněty a řadou chemických sloučenin. Navíc je jejich činnost modulována napětím. Díky polymodálnímu způsobu aktivace je mechanismus vrátkování TRP receptorů velmi komplexní (Nieto-Posadas et al., 2011).

Molekulární struktura TRP receptorů je příbuzná napětově ovládaným draslíkovým (K_v) a sodíkovým kanálům (Na_v). Každá ze čtyř podjednotek TRP iontového kanálu obsahuje 6 transmembránových úseků (S1–S6) a má N- a C-konce umístěny intracelulárně. S5 a S6 spolu s kličkou, která je spojuje, vytvářejí dohromady centrálně uloženou pórovou doménu, jež zajišťuje vodivé propojení mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Konformační změny v rámci této domény jsou podkladem vrátkování iontových kanálů. Pórovou doménu obklopují čtyři periferní domény tvořené S1–S4 segmenty. Intracelulární klička mezi S4 a S5 segmenty propojuje periferní doménu s pórovou oblastí a je důležitá pro správný přenos aktivačního signálu na vrátka TRP receptorů (Boukalova et al., 2010).

U K_v iontových kanálů bylo v nedávné době objeveno druhé kontaktní místo zajišťující funkční interakci periferní domény s pórovou doménou (Lee et al., 2009). Tato styčná plocha obou domén je tvořena částí S1 segmentu směřující do extracelulárního prostoru a pórovým helixem umístěným v kličce mezi S5 a S6 sousední podjednotky a pravděpodobně tvoří důležitý opěrný bod potřebný pro účinnou transdukci signálu od napětově citlivé periferní domény na vrátka K_v kanálů. Funkční význam S1 segmentu ve vrátkování TRP receptorů však dosud nebyl studován.

TRPV1 iontový kanál byl objeven v roce 1997 při hledání molekulární podstaty citlivosti nociceptivních neuronů ke kapsaicinu – pálivé složce paprik (Caterina et al., 1997). Tento iontový kanál je exprimován v nociceptivních C a A δ nervových vláknech, kde slouží jako receptor pro nejrůznější bolestivé stimuly. Mezi endogenní agonisty TRPV1 receptoru se řadí produkty lipoxygenáz, které hrají důležitou úlohu při vzniku zánětlivé bolesti (Hwang et al., 2000). Mimo kapsaicin jsou TRPV1 receptory přímo stimulovány řadou dalších přírodních dráždivých a toxických látek, například alicinem z česneku a cibule či některými komponentami pavoučích jedů (Macpherson et al., 2005; Siemens et al., 2006). TRPV1 receptory lze také aktivovat zvýšením teploty prostředí ($> 42\text{ }^\circ\text{C}$) či snížením pH extracelulárního prostoru (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998).

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 receptorů bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace protonů výrazně zvyšuje pravděpodobnost otevření iontového kanálu, zároveň však snižuje vodivost (Baumann and Martenson, 2000). Mechanismus účinku sníženého pH je zprostředkován elektrostatickou interakcí protonů s několika záporně nabitými aminokyselinovými zbytky S5–S6 kličky, jež je vystavena extracelulárnímu prostředí (Jordt et al., 2000; Liu et al., 2009).

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 strukturní 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. Znamé aktivátory TRPV3 iontového kanálu, jako jsou karvakrol, eugenol, thymol a kafr, jsou izolovány z rostlin užívaných jako koření – dobromysli, hřebíčku, tymiánu a rozmarýnu (Moqrich et al., 2005; Xu et al., 2006). 2-aminoetoxydifenylborát (2-APB), syntetická látka, která inhibuje IP₃ receptory a některé TRP iontové kanály, je společným aktivátorem TRPV1 a TRPV3 receptorů (Hu et al., 2004; Chung et al., 2004). Jediným doposud známým endogenním agonistou TRPV3 iontového kanálu je farnesylpyrofosfát, jeden z meziproductů syntetické dráhy cholesterolu (Bang et al., 2010).

TRPV3 receptory jsou převážně exprimovány v keratinocytech kůže a v buňkách obklopujících vlasový folikul (Peier et al., 2002). Tyto iontové kanály regulují proliferaci a diferenciaci keratinocytů a jsou důležité pro správnou morfogenezi chlupů (Cheng et al., 2010). Nesprávná činnost TRPV3 receptorů se projevuje různými kožními defekty jak u hlodavců, tak u lidí (Asakawa et al., 2005; Asakawa et al., 2006; Lin et al., 2012). V nedávné době bylo prokázáno, že TRPV3 receptor tvoří klíčový článek signální kaskády spouštěné stimulací buněk pomocí epidermálního růstového faktoru (EGF) a transformujícího růstového faktoru- α (TGF- α) (Cheng et al., 2010). U kultivovaných primárních keratinocytů je aktivita TRPV3 iontových kanálů posilována při aktivaci EGF receptoru. Přesný mechanismus, jakým jsou TRPV3 a EGF receptory funkčně propojeny, však nebyl plně objasněn.

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 signální dráhy, které by mohly modulovat funkci TRPV3 iontových kanálů.

3 Materiál a metodika

3.1 Buněčné kultury a příprava mutantních TRPV1 konstruktů

HEK293T buňky (ATCC) byly kultivovány v 5% roztoku fetálního telecího séra (FTS) v médiu OPTI-MEM (Invitrogen). Buňky byly transfekovány cDNA plazmidy kódujícími přirozenou formu a mutantní formy potkaního podtypu TRPV1 receptoru spolu s plazmidy nesoucími DNA pro zelený fluorescenční protein (enhanced GFP) pomocí metody MATra (IBA GmbH). Mutantní TRPV1 konstrukty byly připraveny s využitím chemické soupravy QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Pokusy byly prováděny 24–48 hodin po transfekci.

HaCaT buňky (CLS) byly kultivovány v 10% roztoku FTS v médiu D-MEM (Invitrogen).

3.2 Elektrofyziologická snímání a experimentální roztoky

Veškerá elektrofyziologická měření byla provedena s využitím metody terčíkového zámku v konfiguraci měření z celé buňky a v režimu napěťového zámku. Pokud není uvedeno jinak, byla data pořízena při membránovém potenciálu -70 mV. Sumární proudy tekoucí přes membránu buňky byly zaznamenávány pomocí zesilovače Axopatch 1-D ovládaného programem pCLAMP 10 (Molecular Devices).

Složení extracelulárního roztoku (mM): NaCl 160, HEPES 10, glukóza 10, KCl 2,5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, pH jsme upravovali pomocí NaOH na hodnotu 7,34. V experimentech, kdy byly pokusné buňky stimulovány chemickými agonisty TRPV1 a TRPV3 receptorů, byl použit roztok bez přidaných vápenatých iontů (CaCl₂ byl nahrazen 1 mM EGTA). U roztoků s pH < 6 byl místo HEPES použit MES. Osmolarita extracelulárního roztoku byla 330 mOsm.

Složení intracelulárního roztoku pro HEK293T buňky (mM): Cs-glukono-δ-lakton 125, CsCl 15, EGTA 5, HEPES 10, CaCl₂ 0,5, MgATP 2, osmolarita 279 mOsm. Složení intracelulárního roztoku pro HaCaT buňky (mM): Cs-glukono-δ-lakton 125, CsCl 14, EGTA 5, HEPES 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0,5, MgATP 2, NaGTP 0,3, osmolarita 291 mOsm. pH intracelulárních roztoků jsme upravovali pomocí CsOH na hodnotu 7,28.

Veškeré chemikálie byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich kromě U0126, jež byl zakoupen u společnosti Cell Signaling.

3.3 Analýza dat

Veškerá data byla analyzována pomocí programu pCLAMP 10 a SigmaPlot 10 (Systat Software). 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; τ_1 a τ_2 jsou časové konstanty pro rychlou a pomalou komponentu. Rychlost deaktivace kapsaicinové odpovědi jsme hodnotili pomocí parametru T_{50} , který vyjadřuje čas potřebný ke snížení amplitudy proudu na polovinu.

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. 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:

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

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

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.

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

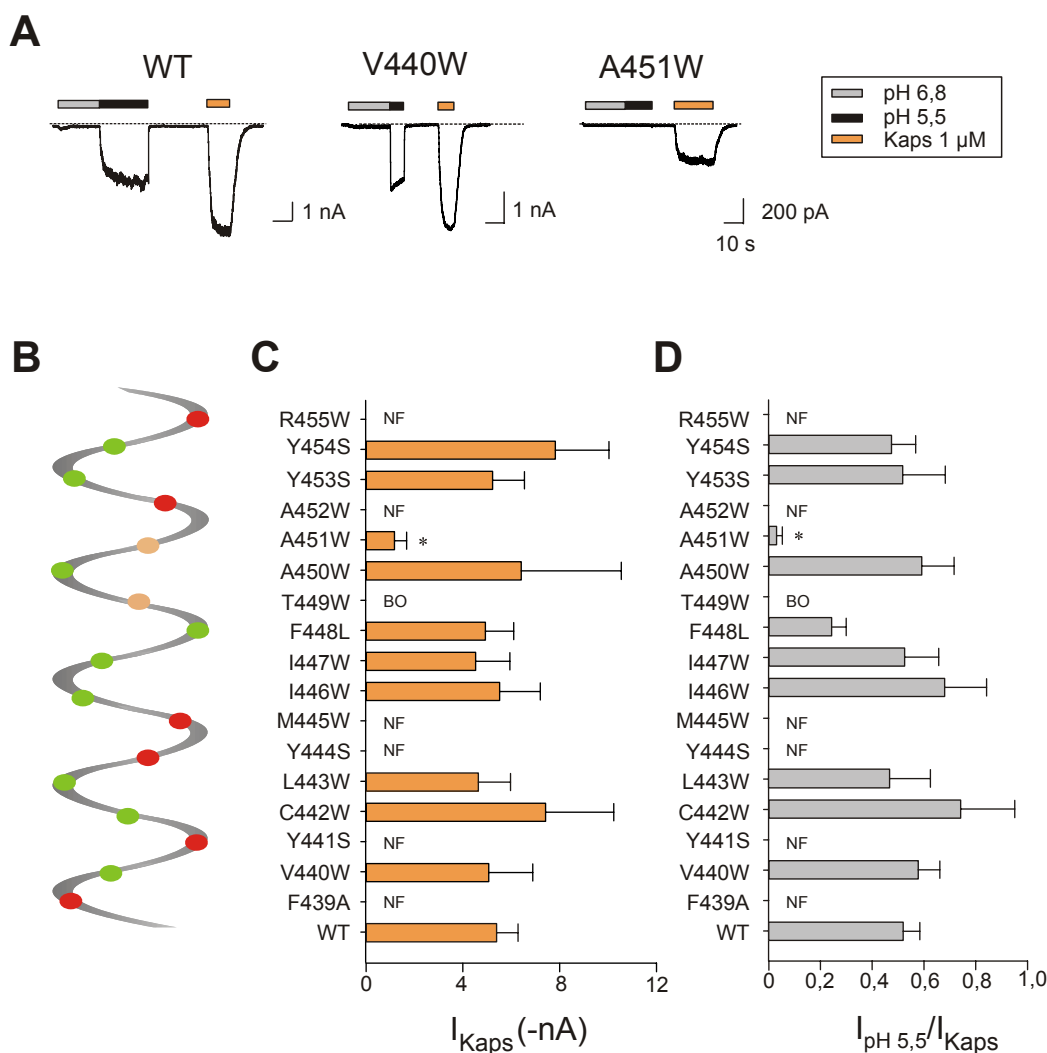
4.1 Úloha S1 transmembránové oblasti ve funkčních vlastnostech TRPV1 iontového kanálu

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, objemnou hydrofobní aminokyselinu. 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 1.

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.

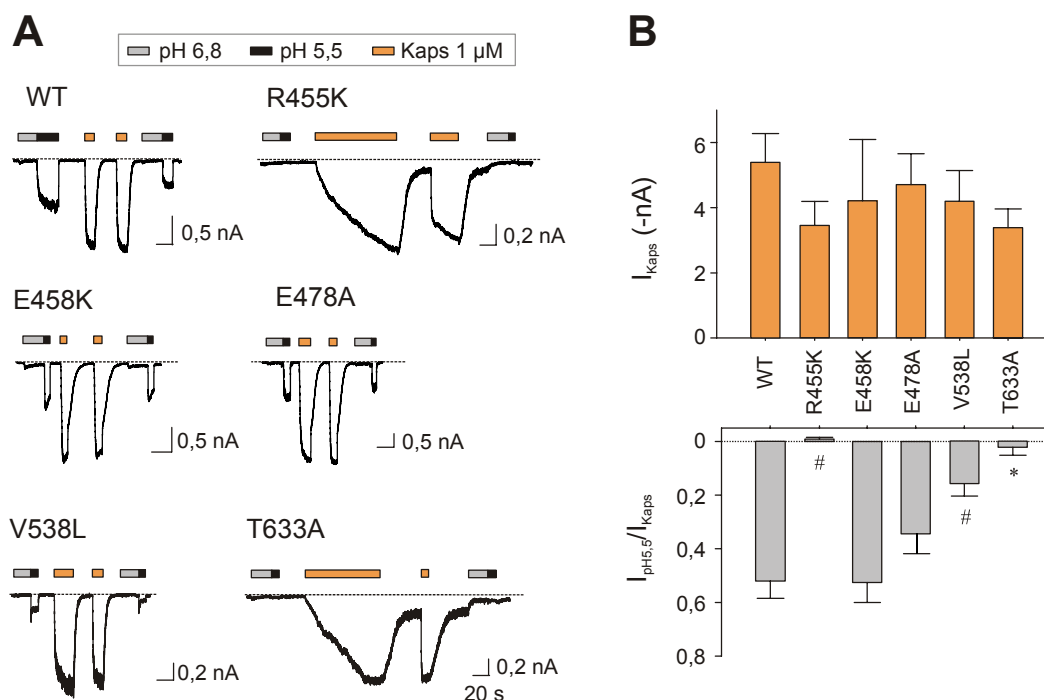
V dalších experimentech jsme se zaměřili na arginin na extracelulárním konci S1 transmembránové oblasti (R455), jehož záměna za tryptofan vedla ke vzniku plně nefunkčního konstruktů. Při záměně R455 za alanin nedošlo k obnovení funkčních vlastností TRPV1 iontového kanálu, což ukazuje na strukturní význam postranního řetězce na dané pozici. Mutantní receptory se záměnou argininu za jiné kladně nabitě reziduum – lysin – vykazovaly proudové odpovědi při aplikaci 1 μ M kapsaicinu, jejichž amplituda se signifikantně nelišila od hodnot charakteristických pro přirozený typ TRPV1 iontového kanálu. 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 2).



Obrázek 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 α -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 μ M kapsaicinu pro jednotlivé konstrukty ($n = 4-31$). (D) Velikost odpovědí vyvolaných snížením pH extracelulárního prostředí (pH 5,5) vztahen k amplitudě odpovědi vyvolané 1 μ M kapsaicinem ($n = 4-12$). BO značí konstrukt, u kterého bylo možné vyvolat proudovou odpověď pouze kombinací chemické a napěťové stimulace.

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 odpovědí vyvolaných kapsaicinem či sníženým pH v porovnání s přirozenou formou TRPV1

iontového kanálu (Obrázek 2). Tyto výsledky naznačují, že případné elektrostatické interakce mezi R455 a E458 či E478 nemají klíčový význam ve funkci TRPV1 receptoru.



Obrázek 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 μM kapsaicinem. (B) Průměrné amplitudy kapsaicinových odpovědí (oranžové sloupce) a relativní amplitudy proudových odpovědí při stimulaci sníženým pH (šedé sloupce) pro jednotlivé konstrukty ($n = 3–31$).

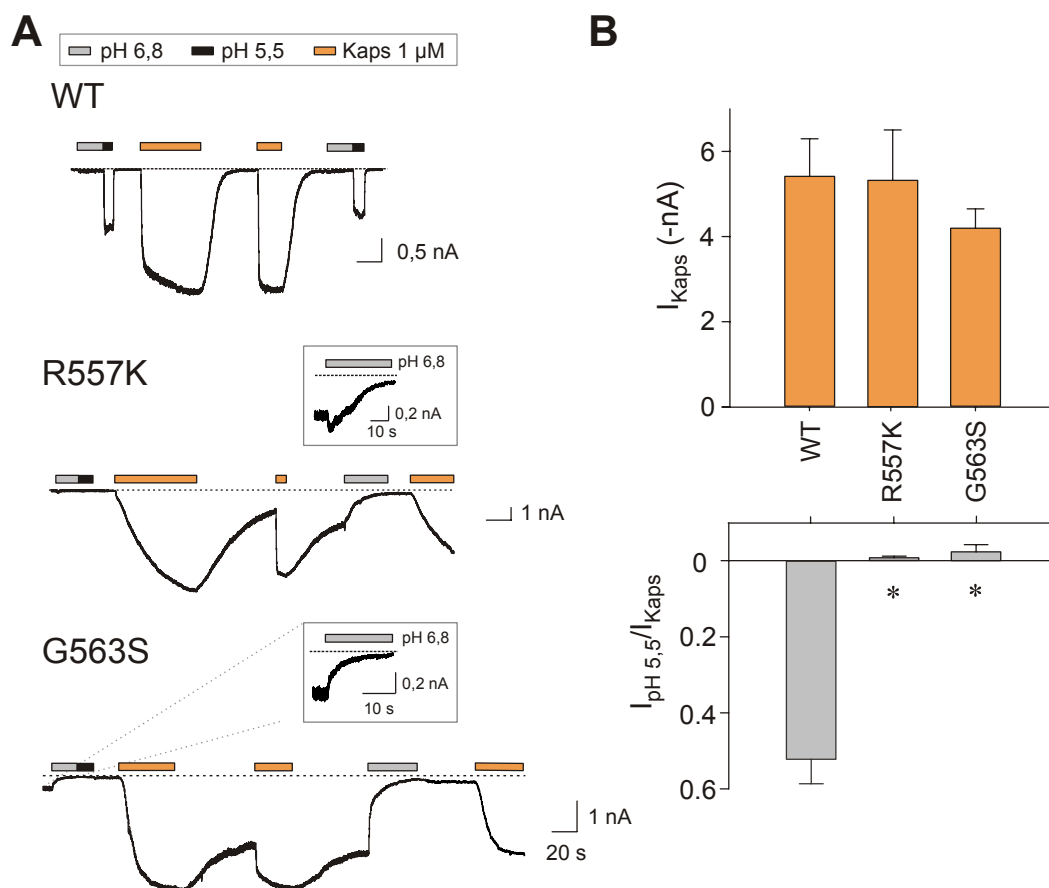
Bodová záměna R455K vedla k odstranění proudových odpovědí při stimulaci roztokem o nízkém pH, amplituda kapsaicinových odpovědí však nebyla signifikantně snížena. Obdobný fenotyp byl popsán u TRPV1 konstruktů se záměnami V538L a T633A (Ryu et al., 2007). Předpokládá se, že tato dvě rezidua hrají významnou 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 2). 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 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.

4.2 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 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 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 3A).



Obrázek 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) a amplitudy proudových odpovědí při stimulaci sníženým pH normalizované vůči amplitudě odpovědi na 1 μM kapsaicin (šedé sloupce; $n = 6-13$).

Z dosavadních zjištění vyplývá, že mutace na různých pozicích v rámci transmembránové oblasti TRPV1 podjednotky, jako jsou extracelulární část S1 segmentu (R455K), spojovací klička mezi S3 a S4 (V538L), S4/S4–S5 oblast (R557K a G563S) a pórový helix (T633A), mohou způsobit vážné postižení 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 (data nejsou ukázána):

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

(ii) Deaktivační fáze kapsaicinové odpovědi (data nejsou ukázána):

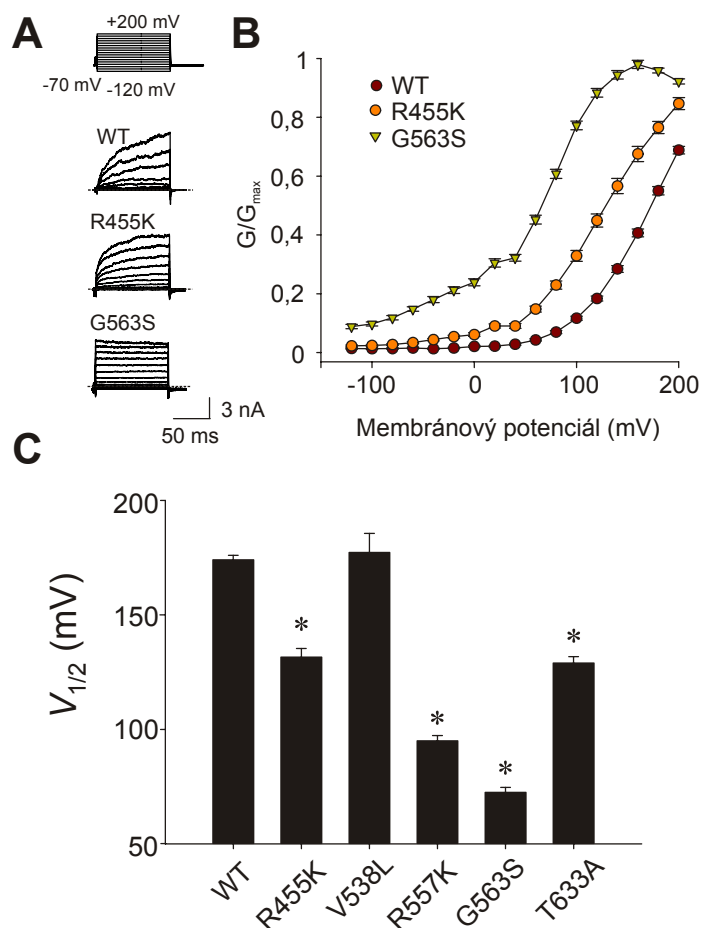
Mutace R455K, R557K, G563S a T633A se projevují signifikantně prodlouženou deaktivační fází kapsaicinových odpovědí ($T_{50} = 10,9 \pm 1,4$ s; $23,4 \pm 4,3$ s; $23,5 \pm 1,5$ s a $12,6 \pm 4,4$ s oproti $4,4 \pm 0,6$ s u přirozeného typu TRPV1 iontového kanálu; $n = 9$ – 30) a také znemožňují plnou 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 ± 6 % pro R455K, 43 ± 14 % pro R557K, 28 ± 4 % pro G563S a 44 ± 15 % pro T633A konstrukt; $n = 9$ – 24).

(iii) Klidový membránový proud (data nejsou ukázána):

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; $32,5 \pm 6,9$ pA; $78,9 \pm 21,4$ pA a $46,5 \pm 7,4$ oproti $13,1 \pm 1,5$ pro přirozenou formu TRPV1 kanálu; $n = 23$ – 81). Klidový membránový proud je u těchto TRPV1 mutantů inhibován aplikací extracelulárního roztoku se sníženým pH (na 63 ± 9 %; 77 ± 10 %; 67 ± 4 % a 81 ± 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 ± 39 %; $n = 10$).

(iv) Depolarizací vyvolaná aktivace TRPV1 konstruktů (Obrázek 4)

Napětovou závislost TRPV1 iontového kanálu jsme studovali s využitím protokolu sestávajícího ze série napětových 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 ± 2 mV ($n = 58$). U konstruktů R455K, R557K, G563S a T633A jsme pozorovali zvýšenou napětovou závislost, což se projevilo posunem hodnoty $V_{1/2}$ do oblasti menší depolarizace ($V_{1/2} = 132 \pm 4$ mV; 95 ± 2 mV; 72 ± 2 mV a 129 ± 3 mV; $n = 25$ – 40).



Obrázek 4. Napětíová citlivost TRPV1 konstruktů. (A) Protokol použitý pro napětíovou 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 ($n = 24-58$). (C) Průměrné hodnoty membránového potenciálu, při kterém dosahuje vodivost buňky poloviny svého maxima ($V_{1/2}$) pro jednotlivé konstrukty ($n = 7-58$).

(v) Teplotní závislost TRPV1 konstruktů (data nejsou ukázána):

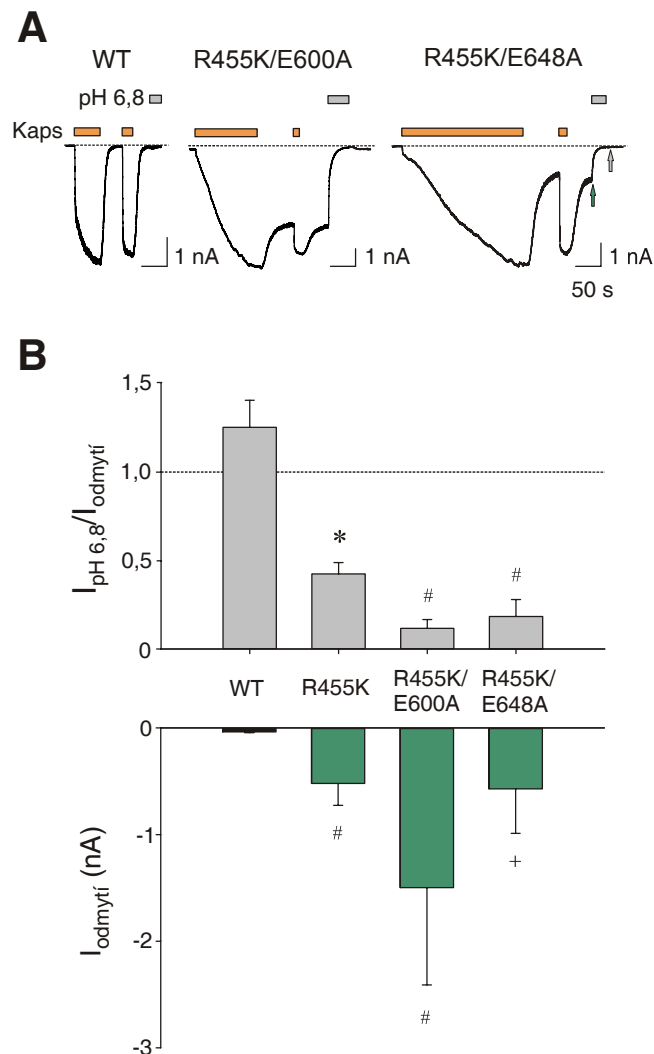
Specifickou aktivaci TRPV1 iontových kanálů lze vyvolat i zvýšením teploty prostředí nad 42 °C. Buňky exprimující TRPV1 receptory vykazují při teplotní stimulaci proudové odpovědi, jejichž amplituda a teplotní závislost charakterizovaná teplotním koeficientem Q_{10} je mnohem vyšší než u nespecifických 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 významně nelišila od nemutované formy TRPV1 ($Q_{10} = 9,2 \pm 3,3; n = 10$).

V dalších pokusech jsme se zaměřili na objasňování mechanismu, jakým zvýšená koncentrace protonů v extracelulárním prostředí umožňuje stabilizaci zavřeného stavu 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. Vystavení buněk roztoku o pH 6,8 vedlo k inhibici zbytkového proudu minimálně do stejné míry jako u TRPV1 receptorů s R455K mutací (Obrázek 5). Z těchto výsledků vyplývá, že inhibiční působení sníženého pH není závislé na protonaci glutamátových reziduí na pozicích 600 a 648.

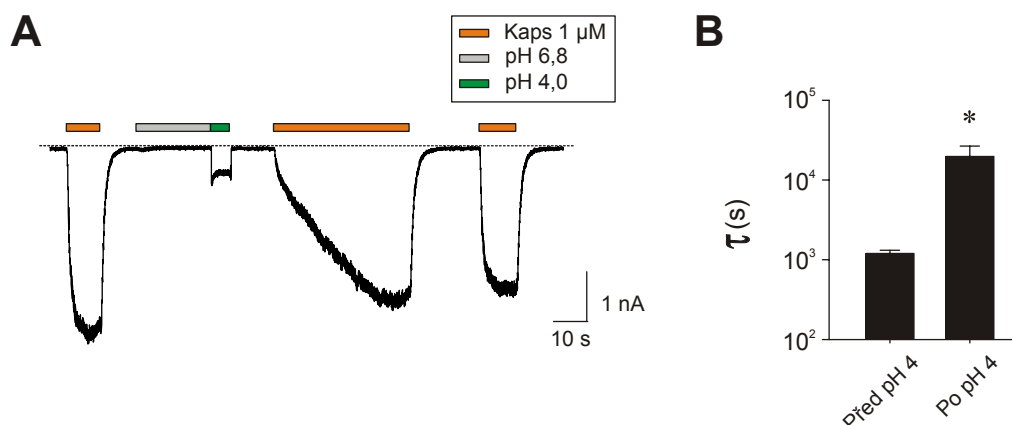


Obrázek 5. Inhibiční účinek protonů není ovlivněn neutralizací aminokyselinových zbytků E600 a E648. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí buněk exprimujících přirozenou formu TRPV1, R455K/E600A a R455K/E648A konstrukty stimulovaných 1 μ M kapsaicinem a při následné aplikaci roztoku se sníženým 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.

4.3 Desenzitizační působení protonů na aktivitu TRPV1 receptoru

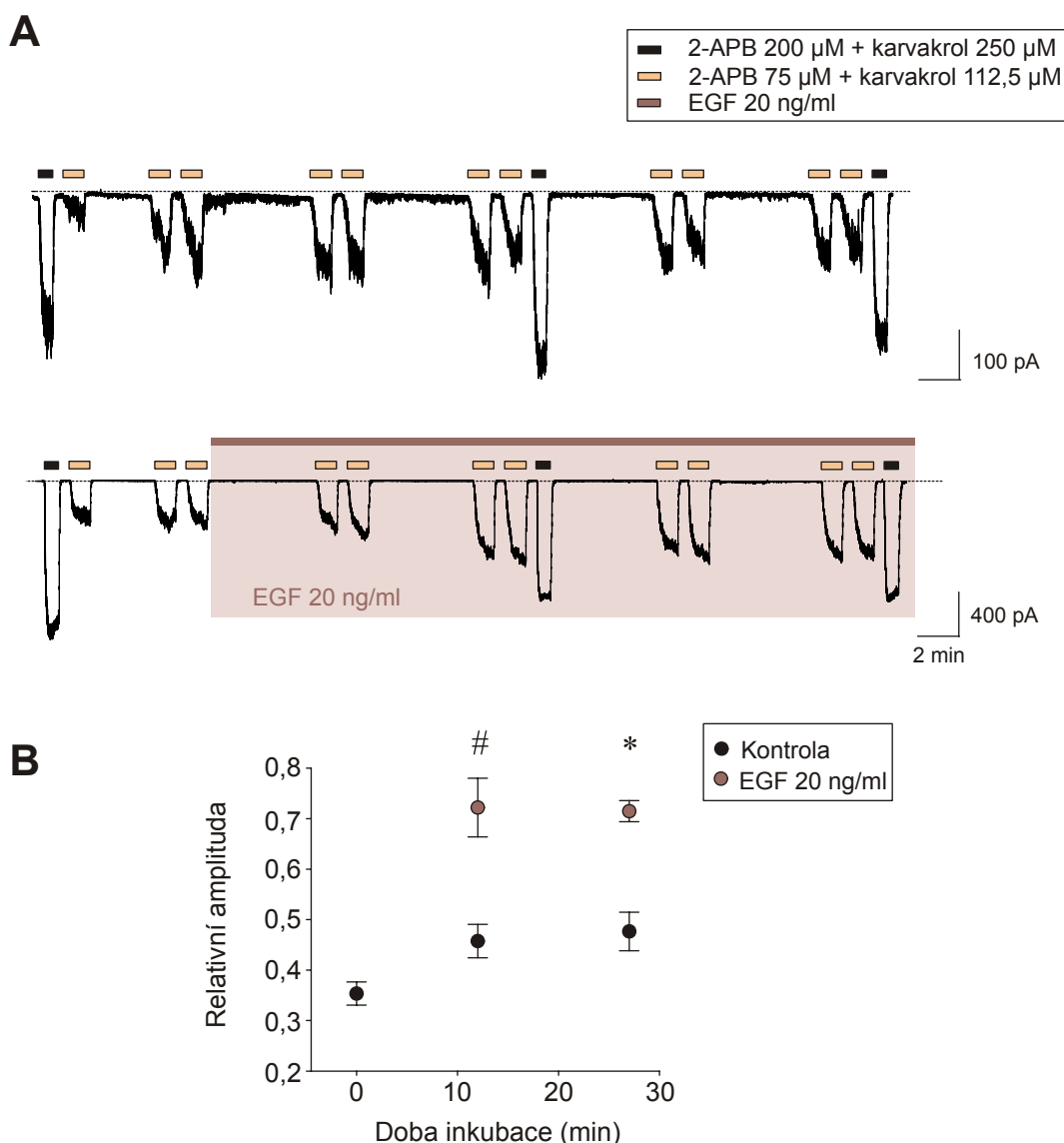
V průběhu našich pokusů zaměřených na stanovení citlivosti k chemickým agonistům jsme u přirozené formy TRPV1 receptoru často pozorovali zpomalení nástupu odpovědi na kapsaicin po vystavení působení sníženého pH. Pro statistické zhodnocení zmíněného efektu jsme buňky exprimující TRPV1 receptor střídavě stimulovali 1 μ M kapsaicinem a extracelulárním roztokem se silně kyselým pH (Obrázek 6). Aplikace roztoku o pH 4,0 vedla 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 popsáných výše.



Obrázek 6. 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 ($n = 7$).

4.4 Modulační účinky epidermálního růstového faktoru na aktivitu TRPV3 receptorů endogenně exprimovaných v HaCaT buňkách

Pro zhodnocení účinku epidermálního růstového faktoru na aktivitu endogenních TRPV3 receptorů jsme porovnávali velikosti proudových odpovědí HaCaT buněk vyvolaných směsí agonistů před a v průběhu aplikace EGF (Obrázek 7). Již po dvanácti minutách inkubace v roztoku s 20 ng/ml EGF se průměrná amplituda odpovědí 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. V kontrolních podmínkách, kdy EGF nebyl přítomen, se relativní amplituda odpovědí 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.

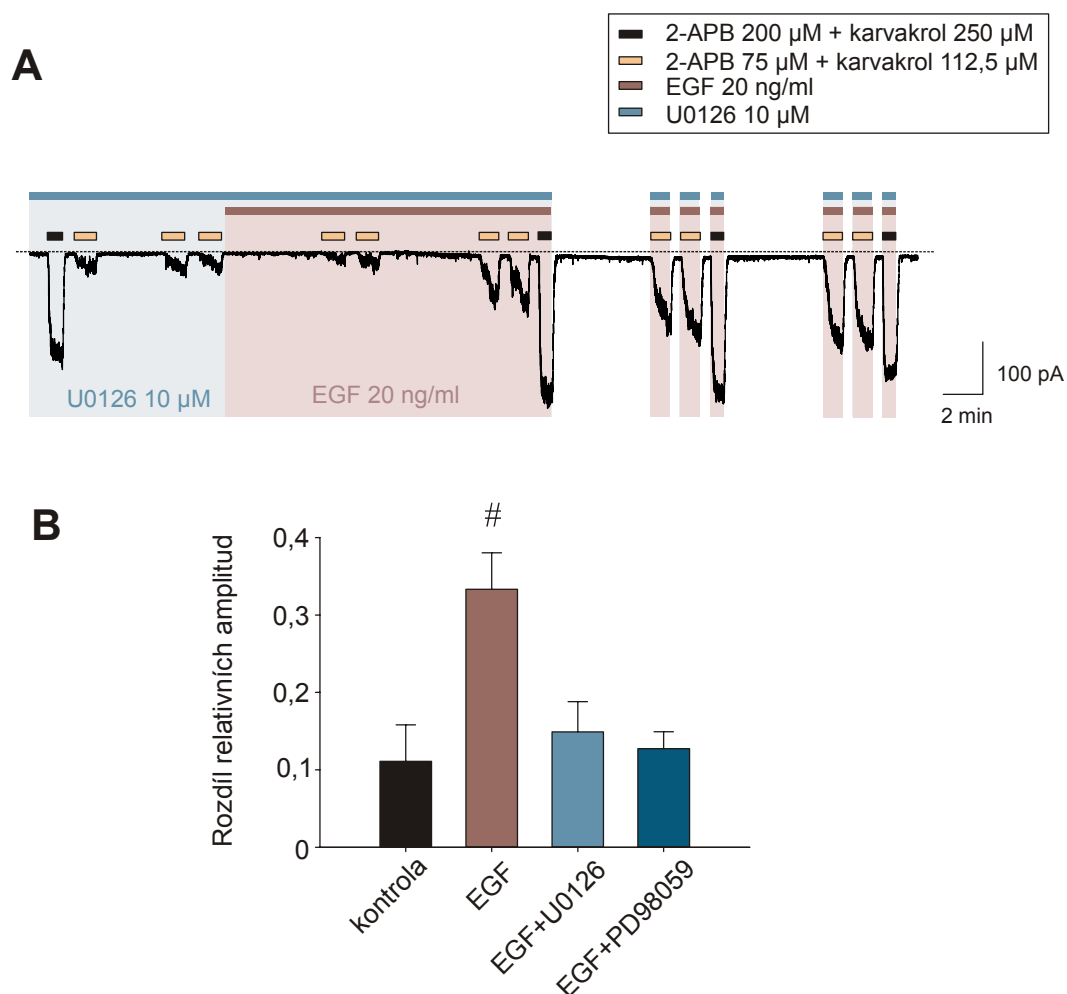


Obrázek 7. EGF působí senzitivizačně na aktivitu TRPV3 receptorů. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí HaCaT buněk vyvolané chemickou stimulací v kontrolních podmínkách (horní záznam) a v přítomnosti EGF (spodní záznam). (B) Amplituda odpovědi vyvolaná aplikací 75 μ M 2-APB v kombinaci s 112,5 μ M karvakrolem normalizovaná vůči maximální odpovědi vyvolané saturační koncentrací agonistů (200 μ M 2-APB s 250 μ M karvakrolu)($n \geq 5$).

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

Abychom stanovili význam MAPK dráhy v senzitivizaci 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 μ M U0126 nebo 30 μ M PD98059 nedošlo k signifikantní senzitivizaci odpovědi vyvolaných směsí

agonistů v porovnání s kontrolními podmínkami (Obrázek 8). Senzitizační účinky epidermálního růstového faktoru tedy byly potlačeny inhibicí MAPK dráhy.



Obrázek 8. 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 μ M 2-APB s 112,5 μ M karvakrolu na začátku měření a po 12 minutách inkubace v přítomnosti EGF. K nárůstu velikosti odpovědí nedošlo při inkubaci buněk s inhibitory MAPK dráhy – U0126 (10 μ M) či PD98059 (30 μ M)($n = 4-7$).

5 Diskuze

5.1 Mutační studie zaměřená na transmembránovou doménu TRPV1 receptoru

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. 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 periodicitu charakteristická pro α -helikální struktury. Tato oblast transmembránové domény pravděpodobně slouží jako důležité interakční místo S1 s jinou částí iontového kanálu. Konzervativní mutace argininu na pozici 455 za lysin 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 klíčku 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.

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 napětové 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.

Inhibice aktivity vyvolaná zvýšením koncentrace protonů v extracelulárním 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, zamýšleli jsme 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 vodivosti 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.

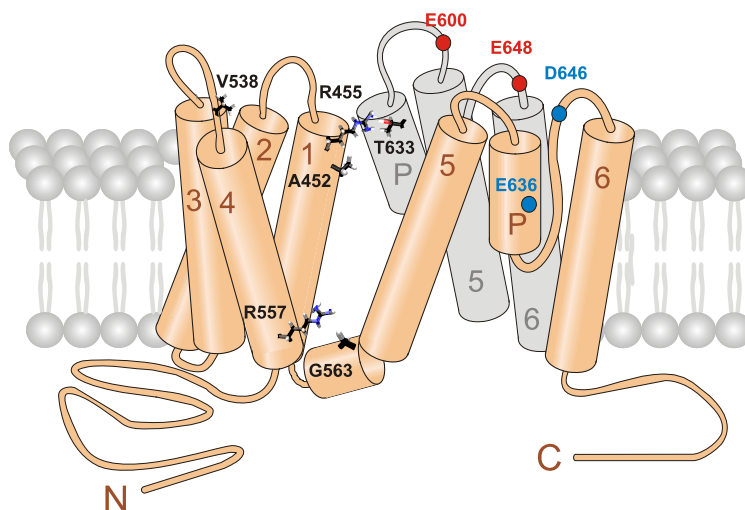
Funkční charakterizací konstruktů s dvojitými záměnami R455K/E600A a R455K/E648A jsme prokázali, že přinejmenším u R455K mutantního receptoru není inhibiční účinek protonů závislý na přítomnosti extracelulárních senzorů sníženého pH. Neutralizace záporně nabitých aminokyselinových zbytků E600 a E648,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

U námi popsaných konstruktů se zvýšenou aktivitou 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.

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 jasně 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 déletrvajícím 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 R455K, 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 9).



Obrázek 9. 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 blokové 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 immortalizovaných 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 přímá fosforylace TRPV3 receptoru ERK kinázou, mezi jejíž substráty se řadí i některé iontové kanály (Schraeder et al., 2006; Shen et al., 2011).

Nedávno byla popsána důležitá úloha TRPV3 receptoru v signalizační dráze EGF a TGF- α , která má zásadní význam pro správnou funkci buněk pokožky (Cheng et al., 2010). Naše výsledky přispívají k objasnění, jakými mechanismy jsou EGF receptor a TRPV3 iontový kanál funkčně propojeny.

6 Závěry

- 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.
- Krátkodobá stimulace HaCaT buněk epidermálním růstovým faktorem (EGF) vede k senzitivaci endogenních TRPV3 receptorů. Působení 20 ng/ml EGF po dvanácti minutách inkubace zvyšuje relativní průměrnou amplitudu odpovědi zprostředkovaných TRPV3 receptorem na dvojnásobek.
- Modulační působení EGF je závislé na aktivitě MAPK dráhy. Senzitivace odpovědi 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.

1 Introduction

Transient receptor potential (TRP) receptors are non-selective cation channels, which are almost ubiquitously expressed in animal tissues, serving a variety of functions. Many of these channels are involved in transduction of sensory stimuli and mediate sensations of light, touch and taste (Damann et al., 2008). Recently, it has been shown that several TRP channels are specifically activated by changes in temperature. These so-called thermosensitive TRP channels are responsible for transduction of heat or cold but they also respond to a diverse types of chemical and mechanical stimuli. In addition, their activity is modulated by voltage. Due to this polymodal nature, the gating mechanisms of the thermosensitive TRP channels are very complex (Nieto-Posadas et al., 2011).

The overall structure of TRP receptors is similar to voltage-gated potassium (K_v) and sodium (Na_v) channels. They consist of four subunits, each with 6 transmembrane segments (S1–S6) and intracellularly located N- and C-termini. S5 and S6 segments together with the P-loop connecting them form the pore-lining domain located centrally. The pore domain is surrounded by four peripheral domains formed by S1–S4 segments. The intracellular linker between S4 and S5 connects the peripheral domain with the pore region and is important for transmission of activation signal to the gate of TRP channels (Boukalova et al., 2010).

In K_v channels, a second contact region between peripheral domain (called voltage-sensing domain) and the pore domain formed by extracellular portion of S1 and the pore helix located in the P-loop of adjacent subunit is required for channel functioning (Lee et al., 2009). This interface probably acts as an anchor point between the voltage sensing domain and the pore necessary for an efficient transmission of conformational changes to the gate. In TRP receptors, the role of S1 in channel gating has not yet been studied.

The first thermosensitive TRP channel – TRPV1 – was identified in 1997 as a receptor for capsaicin, the pungent compound of chilli peppers (Caterina et al., 1997). TRPV1 is expressed in nociceptive C and $A\delta$ nerve fibres and serves as an integrator of various painful stimuli. In addition to capsaicin, TRPV1 receptor is activated by other natural irritants such as allicin from garlic or by spider toxins (Macpherson et al., 2005; Siemens et al., 2006). Endogenous agonists of TRPV1 are some products of lipoxygenases, which are involved in development of inflammatory pain (Hwang et al., 2000). TRPV1 is also activated by increased temperature (> 42 °C) and by acidic pH (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998).

Protons are physiologically important agonists of TRPV1 receptor. At room temperature, TRPV1 is activated by severe acidification of extracellular solution (< 6). Additionally, mildly acidic pH potentiates responses of TRPV1 to both capsaicin and heat and also lowers the threshold temperature for activation (Tominaga et al., 1998). Analysis of single-channel activity revealed that elevated concentration of protons increases the probability of opening of the TRPV1 channel but also reduces channel conductance (Baumann and Martenson, 2000). The effects of low pH are mediated by electrostatic interactions of protons with several negatively charged residues in the P-loop, which face the extracellular space (Jordt et al., 2000; Liu et al., 2009).

TRPV3 is another member of the vanilloid receptor family which activity is modulated by temperature. In heterologous expression system, TRPV3 is activated by moderate temperatures with threshold of approximately 33 °C and its activity increases with increasing temperature (Peier et al., 2002; Smith et al., 2002). Some natural compounds which evoke sensations of warmth – carvacrol from oregano, eugenol from clove, thymol from thyme and camphor from rosemary – are agonists of TRPV3 (Moqrich et al., 2005; Xu et al., 2006). 2-aminoethoxydiphenyl borate, a synthetic compound which inhibits IP_3 receptors, is a common activator of TRPV1 and TRPV3 (Hu et al., 2004; Chung et al., 2004). So far, the

only known endogenous agonist of TRPV3 is farnesyl pyrophosphate, an intermediate in the cholesterol synthesis pathway (Bang et al., 2010).

TRPV3 receptors are mainly expressed in skin keratinocytes and hair follicles (Peier et al., 2002). They are important for hair morphogenesis and act as regulators of keratinocyte proliferation and differentiation (Cheng et al., 2010). The impaired functioning of the TRPV3 channels can result into miscellaneous skin defects, either in rodents or in humans (Asakawa et al., 2005; Asakawa et al., 2006; Lin et al., 2012). Recently it has been demonstrated that TRPV3 is a key element in the signalling pathway of growth factors – epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor- α (TGF- α)(Cheng et al., 2010). In cultured primary keratinocytes the activity of TRPV3 channels is enhanced by stimulation of EGF receptors. The exact mechanism how TRPV3 channels and EGF receptors are functionally coupled is unknown.

2 Aims of the study

- Elucidate the role of individual residues in the S1 transmembrane region in activation properties of TRPV1 ion channels.
- Examine the pH sensitivity of the mutant TRPV1 ion channels.
- Electrophysiologically characterize TRPV3 ion channels endogenously expressed in immortalized human keratinocyte cell line HaCaT.
- Examine the possible intracellular signalling pathways which could modulate the function of TRPV3 receptors.

3 Materials and methods

3.1 Cell culture and preparation of TRPV1 constructs

HEK293T cells (ATCC) were cultured in OPTI-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Cells were transiently transfected with a cDNA plasmid encoding wild-type or mutant TRPV1 (rat subtype) and enhanced green fluorescent protein (eGFP) using MATra method (Magnet-assisted Transfection; IBA GmbH). The TRPV1 constructs were generated using a QuikChange XL Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene). Experiments were performed 24–48 h after transfection.

HaCaT cells (CLS) were cultured in D-MEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS.

3.2 Electrophysiological recordings and experimental solutions

Experiments were performed using patch clamp method, in whole-cell voltage clamp mode. If not stated otherwise, the data were obtained at membrane potential -70 mV. Membrane currents were recorded with Axopatch 1-D amplifier controlled by pCLAMP 10 software (Molecular Devices).

Composition of extracellular solution (mM): NaCl 160, HEPES 10, glucose 10, KCl 2.5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, adjusted to pH 7.34 with NaOH. In order to prevent desensitization, the chemical-induced activity of TRPV1 was studied in Ca²⁺-free solution, in which CaCl₂ was replaced with 1 mM EGTA. In solutions of pH < 6, MES buffer was used instead of HEPES. Osmolarity of the extracellular solution was 330 mOsm.

Composition of intracellular solution used in experiments with HEK293T cells (mM): cesium gluconate 125, CsCl 15, EGTA 5, HEPES 10, CaCl₂ 0.5, MgATP 2, osmolarity 279 mOsm. Composition of intracellular solution used in experiments with HaCaT cells

(mM): cesium gluconate 125, CsCl 14, EGTA 5, HEPES 10, MgCl₂ 0.5, CaCl₂ 0.5, MgATP 2, NaGTP 0.3, osmolarity 291 mOsm. pH of intracellular solutions was adjusted with CsOH to 7.28.

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, except for U0126 (Cell Signaling).

3.3 Data analysis

All data were analyzed using pCLAMP 10 and SigmaPlot 10 (Systat Software). To evaluate the kinetics of capsaicin-induced responses, the onset phase of currents evoked by capsaicin was fitted to double exponential function: $I(t) = A_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + A_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + C$, where $I(t)$ is the amplitude of the current in time t ; A_1 and A_2 represent amplitudes of slow and fast component of the current response; C is maximal amplitude; τ_1 and τ_2 are time constants for slow and fast component. The kinetics of capsaicin washout was determined as the time taken for the current to decrease to 50% of its level before removing the agonist.

Voltage-induced activation of TRPV1 was studied using a protocol consisting of 100 ms voltage steps from -120 mV to 200 mV. The difference between each step was 20 mV. The amplitude of the current was determined at the end of each pulse when a steady state was reached. The conductance-voltage relationship was fitted to the Boltzmann equation:

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

where G_{\max} is maximal whole-cell conductance; G_{\min} is minimal whole-cell conductance; z represents gating charge; F is Faraday constant; V is voltage; $V_{1/2}$ is the half-activation voltage; R is gas constant and T is absolute temperature.

The temperature sensitivity of TRPV1 constructs was determined using precise regulation of the temperature of experimental solutions applied on a cell, which was linearly increased from room temperature up to 48 °C. Temperature coefficients for each construct were estimated using the formula:

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

where A_1 and A_2 are the current amplitudes obtained at temperature T_1 (42 °C, the temperature threshold for TRPV1 receptors) and T_2 (45 °C). Q_{10} represents the theoretical value of current response augmentation when there is a 10 °C rise in temperature. The higher is the value of Q_{10} , the higher is the temperature sensitivity of ion channel.

Overall statistical significance was determined by the analysis of variance (ANOVA) for each data group. When significance was found ($P < 0.05$), statistical comparisons were performed using t test or the Mann-Whitney U test for individual groups. All data are expressed as mean \pm standard error of the mean. Significant differences are marked by * $P < 0.001$; # $P < 0.01$; + $P < 0.05$.

4 Results

4.1 The role of S1 transmembrane segment in functional properties of TRPV1 ion channel

In order to determine the role of S1 in TRPV1 functioning, we studied the effects of point mutations in this region (residues F439 to R455). The residues were substituted, one by one, with bulky hydrophobic amino acid – tryptophan. The aromatic residues were

replaced by non-aromatic amino acid side chains to impair their potential interactions with lipids or with other residues in TRPV1 protein complex.

To assess the functional role of mutant ion channels, we measured the membrane currents of HEK293T cells transfected with TRPV1 constructs in response to application of capsaicin or low pH (pH 5.5). The results of the mutagenesis analysis of S1 are summarized in figure 1.

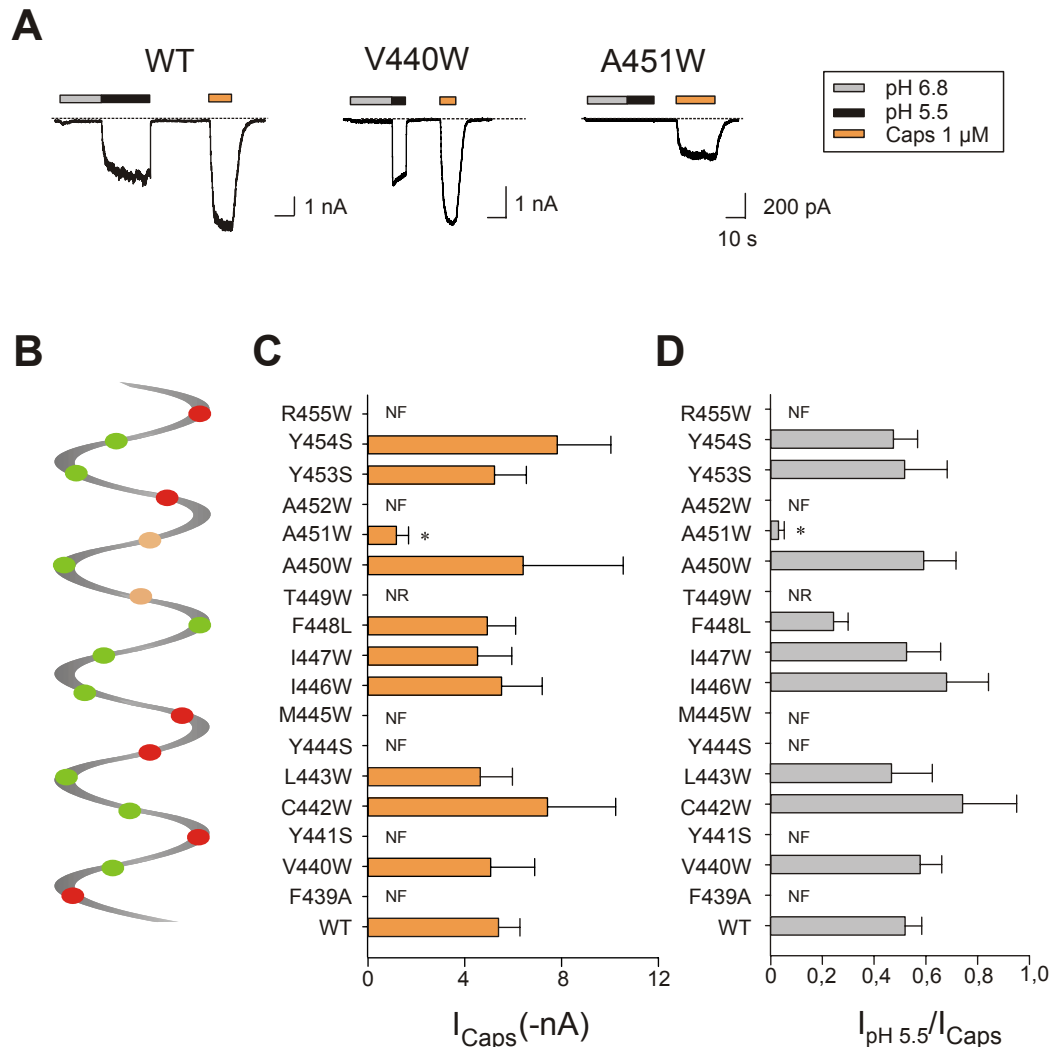


Figure 1. Mutational analysis of S1 transmembrane region of TRPV1 receptor. (A) Representative whole-cell current responses of HEK293T cells expressing wild-type TRPV1, V440W and A451W mutants evoked by pH 5.5 and 1 μM capsaicin. To desensitize endogenous acid-sensing ion channels, we applied a solution of pH 6.8 prior to applying the solution of pH 5.5 (Gunthorpe et al., 2001). (B) Putative α-helical topology of S1 transmembrane segment of TRPV1. Green symbols indicate positions which are insensitive to mutagenesis. Orange symbols represent position of residues which, when mutated, strongly affect TRPV1 channel functionality. Red symbols indicate non-functional (NF) mutants. (C) Mean whole-cell current amplitudes of responses evoked by 1 μM capsaicin ($n = 4-31$). (D) Mean amplitudes of responses evoked by pH 5.5 normalized to responses elicited by application of 1 μM capsaicin ($n = 4-12$). NR marks mutant TRPV1 receptor in which we only observed measurable capsaicin responses at positive membrane potentials. Holding potential -70 mV.

Six out of seventeen constructs were non-functional. Cells expressing TRPV1 ion channels with point mutation F439A, Y441S, Y444S, M445W, A452W and R455W did not respond to chemical stimulation, either alone or in combination with depolarizing voltage,

which in wild-type TRPV1 induces marked increase in cell conductance. In T449W construct, we observed only small currents at positive membrane potentials.

In follow-up experiments, we focused on arginine at the extracellular end of S1 transmembrane region (R455). Substitution of this residue with tryptophan led to a complete loss of function. R455A construct was also non-functional, which indicate that the side chain at this position is structurally important. Charge conserving mutation R455K did not affect the magnitude of capsaicin-evoked responses but the kinetics of the first capsaicin response was markedly slowed down and the deactivation after capsaicin washout was incomplete. Surprisingly, the R455K construct was insensitive to stimulatory effects of low pH (pH 5.5), on the contrary, even mild acidification of extracellular solution (pH 6.8) induced a rapid deactivation of the current remaining after capsaicin washout (Figure 2).

We searched for possible interaction partners of arginine 455. According to the homology model of TRPV1, two glutamate side chains are located near the arginine 455 – E458 located three amino acid residues upstream from R455, and E478 in the putative upper part of S2 transmembrane segment of the same TRPV1 subunit (Brauchi et al., 2007). To eliminate possible electrostatic interactions with R455, we introduced charge-reversing (E458K) or charge-neutralizing (E478A) mutations at these two positions and assessed the functional properties of the constructs. The responses of E458K and E478A mutants evoked by low-pH or capsaicin were not significantly different from wild-type TRPV1 (Figure 2). These results indicate that the possible electrostatic interactions between R455 and E458 or E478 are not important for TRPV1 function.

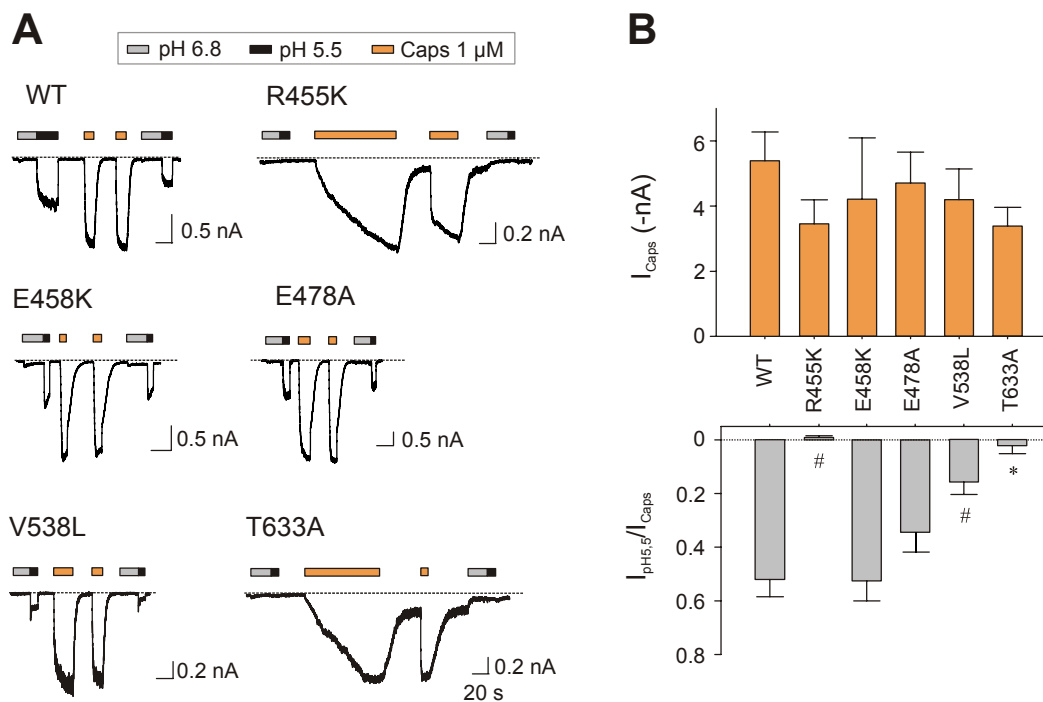


Figure 2. TRPV1-R455K and T633A constructs are insensitive to stimulatory effects of protons. (A) Representative current responses of cells expressing wild-type and mutant ion channels to application of solution of pH 5.5 and 1 μ M capsaicin. (B) Mean amplitudes of capsaicin responses (orange columns) and relative amplitudes of low pH-evoked responses (grey columns) for each construct ($n = 3-31$).

R455K mutation eliminated low pH-induced current responses; on the contrary, the mean amplitude of capsaicin-evoked responses was not significantly different between R455K construct and wild-type TRPV1. Similar phenotype has been previously reported for the V538L and T633A mutants of rat TRPV1 (Ryu et al., 2007). It was proposed that the two residues are involved in the transduction of the protonation signal into channel opening. In order to compare the activation properties of R455K mutant with that of V538L and T633A constructs, we characterized the current responses mediated by the latter two mutants evoked by low pH and capsaicin.

We confirmed that V538L and T633A substitutions impair the sensitivity of TRPV1 to low pH while preserving the maximum capsaicin-evoked responses (Figure 2). In T633A construct, we observed similar phenotypic properties as in R455K mutant, including slowed kinetics of the first capsaicin response, incomplete deactivation after capsaicin washout and inhibitory effect of protons (Figure 2A). Threonine at position 633 is located in the pore helix of the P-loop distant from the S1 helix of the same subunit. The similar phenotype of T633A and R455K mutants is therefore surprising.

4.2 The overactive TRPV1 mutants are inhibited by protons

In my master thesis I described two overactive TRPV1 constructs with mutation in the fourth transmembrane segment and the S4–S5 linker (R557K and G563S). In R557K and G563S mutants, we observed increased voltage dependence; in addition, the G563S construct displayed elevated basal activity at negative potentials. Furthermore, the kinetics of capsaicin-evoked responses of the two mutants was markedly slowed down and the deactivation after capsaicin washout was incomplete (Figure 3)(Boukalova et al., 2010). However, the sensitivity of R557K and G563S to low pH has not been examined.

In further experiments, we determined the functional properties of R557K and G563S mutants in regard to proton-mediated activity (Figure 3). Application of a solution of pH 5.5 did not evoke any increase in current mediated by R557K and G563S mutant ion channels; on the contrary, even mildly acidic pH (pH 6.8) induced deactivation of the basal current. The inhibitory effect was apparent after capsaicin stimulation when the reduction of pH led to decrease in the remaining current after capsaicin washout. This inhibitory effect of protons was not readily reversible, so that no currents were induced after washing out the acidic solution, and subsequent application of 1 μ M capsaicin exhibited slowed activation kinetics, indicating that protons do not inhibit TRPV1 mutants by a simple pore blocking mechanism.

Our results indicate that mutations at different positions in the transmembrane region of TRPV1 subunit such as extracellular portion of S1 (R455K), S3–S4 linker (V538L), S4/S4–S5 region (R557K and G563S) and the pore helix (T633A) may impair pH sensitivity of TRPV1 ion channel while preserving the maximum capsaicin-induced responses. In order to compare the phenotype of these mutants, we performed a series of experiments examining the different aspects of TRPV1 activation.

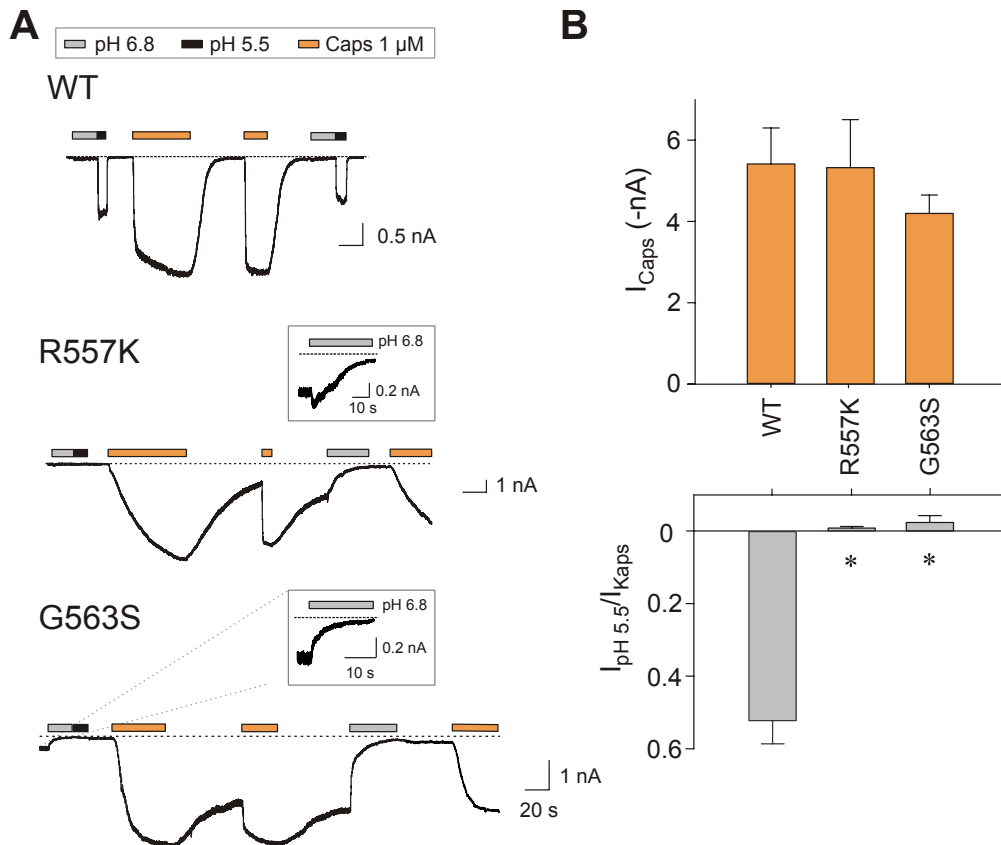


Figure 3. The effect of protons on the activity of R557K and G563S constructs. (A) Representative recordings of current responses of the cells expressing wild-type and overactive mutant TRPV1 channels in response to application of capsaicin and low pH. (B) Mean amplitudes of capsaicin responses (orange columns) and normalized amplitudes of pH 5.5-evoked responses (grey columns; $n = 6-13$).

(i) The onset rate of capsaicin-induced responses (data not shown).

We stimulated the TRPV1 constructs with two consecutive applications of 1 μM capsaicin. A two-exponential fit of the time course of current activation was performed to accurately describe the combination of the fast and slow component of the onset of the first and second capsaicin response. In wild-type TRPV1, the slow component of the first capsaicin response represented 26.9 ± 5.3 % of the whole inward current and in second response 8.6 ± 2.7 % ($n = 34$). In R557K and G563S, the fast component of the first capsaicin response was completely eliminated ($A_2 = 100$ %) and in second response the slow component was significantly increased (to 37.1 ± 14.3 % and 49.2 ± 7.8 %, respectively; $n = 8$ and 9). The kinetics of the onset of the first capsaicin response was slowed in R455K and T633A constructs due to the prolongation of time constant of the slow component ($\tau = 77.1 \pm 19.8$ s and 73.7 ± 8.8 s versus 22.4 ± 4.2 s for wild-type TRPV1; $n = 5-18$). V538L mutation did not affect the kinetics of capsaicin-induced responses.

(ii) Kinetics of capsaicin-evoked response offset (data not shown).

Substitutions R455K, R557K, G563S and T633A led to prolonged offset phase of capsaicin-induced responses ($T_{50} = 10.9 \pm 1.4$ s; 23.4 ± 4.3 s; 23.5 ± 1.5 s and 12.6 ± 4.4 , respectively; $n = 9-30$) compared to wild-type TRPV1 ($T_{50} = 4.4 \pm 0.6$ s; $n = 32$) and prevented the deactivation after washout of agonist. The mean amplitude of the current remaining after capsaicin washout was 0.52 ± 0.21 nA in R455K ($n = 18$), 1.79 ± 0.65 nA in R557K ($n = 9$), 2.34 ± 0.61 nA in G563S ($n = 24$) and 0.98 ± 0.35 nA in T633A construct ($n = 13$) compared to 0.04 ± 0.01 nA in wild-type TRPV1 ($n = 19$). This remaining current was partially blocked by lowering the pH of the extracellular solution from pH 7.3 to 6.8.

An acidic solution diminished the inward steady-state current after capsaicin washout to $42 \pm 6 \%$ in R455K, $43 \pm 14 \%$ in R557K, $28 \pm 4 \%$ in G563S and $44 \pm 15 \%$ in T633A construct ($n = 9-24$).

(iii) Basal activity of TRPV1 mutants (data not shown):

To analyze the extent of basal activity in the low-pH-insensitive mutants, we measured the inward current amplitudes at -70 mV before the application of any agonist. The amplitude of the basal current was enhanced in cells expressing R455K, R557K, G563S and T633A mutants ($I_{basal} = 56.0 \pm 13.5$ pA; 32.5 ± 6.9 pA; 78.9 ± 21.4 pA and 46.5 ± 7.4 pA, respectively, compared to 13.1 ± 1.5 pA in wild-type TRPV1; $n = 23-81$). The application of an acidic solution of pH 6.8 potentiated the basal currents in wild-type TRPV1 to $221 \pm 39 \%$ ($n = 10$). However, it significantly inhibited R455K (to $63 \pm 9 \%$, $n = 3$), R557K (to $77 \pm 10 \%$; $n = 8$), G563S (to $67 \pm 4 \%$; $n = 21$) and T633A (to $81 \pm 13 \%$; $n = 8$) mediated currents, suggesting that protons change the basal open-closed equilibrium by promoting the closed state of these mutant channels.

(iv) Voltage sensitivity of TRPV1 constructs (Figure 4):

An overactive mutant ion channel is expected to have an already shifted voltage dependence because of the altered equilibrium between the opened and closed state. Indeed, we found that the conductance-to-voltage relationships were dramatically shifted towards less depolarizing potential in R455K (by 42.4 ± 3.7 mV; $n = 25$), in R557K (by 79.0 ± 2.3 mV; $n = 40$), in G563S (by 101.5 ± 2.2 mV; $n = 25$) and in T633A (by 45.1 ± 2.9 mV; $n = 28$).

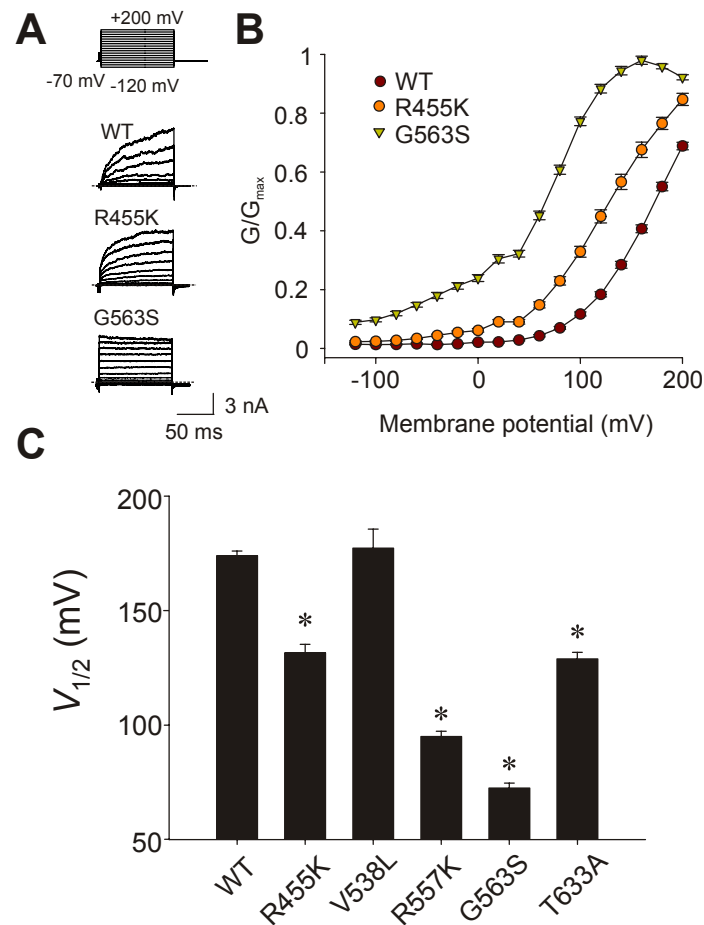


Figure 4. Voltage dependence of TRPV1 mutants. (A) Representative current traces in response to family of 100 ms voltage steps from -120 mV to 200 mV for wild-type TRPV1 and indicated mutants. (B) Normalized conductance-voltage relationship for wild-type TRPV1, R455K and G563S mutants ($n = 24-58$). The voltage dependence of R455K and G563S is shifted towards less depolarizing potentials. (C) Half activation voltage ($V_{1/2}$) for wild-type TRPV1 and indicated mutants ($n = 7-58$).

(v) Temperature sensitivity of TRPV1 mutants (data not shown):

Increasing the temperature of extracellular solution above 42 °C activates TRPV1 ion channels. We determined the value of temperature coefficient (Q_{10}) for wild-type and mutant TRPV1 from current responses evoked by application of 25–48 °C heat ramps. In R455K, R557K, G563S and T633A the steep temperature-dependence was abolished ($Q_{10} = 2.3 \pm 0.3$; 2.1 ± 0.5 ; 1.4 ± 0.1 and 2.0 ± 0.3 , respectively; $n = 9–23$). The temperature sensitivity of V538L construct ($Q_{10} = 9.2 \pm 3.2$; $n = 10$) was not significantly different from wild-type TRPV1 ($Q_{10} = 7.6 \pm 0.9$; $n = 29$).

We performed additional experiments aimed at elucidating the mechanism by which the increased concentration of protons in the extracellular solution stabilize the closed conformation of ion channels with R455K, R557K, G563S and T633A mutations. Considering the rapid onset of the inhibitory effect of low pH, we presumed that protons act directly on TRPV1. We formulated two hypotheses:

- (i) Protonation of two glutamate residues E600 and E648 stimulate increased activity in wild-type TRPV1 (Jordt et al., 2000) but it has an opposite effect on mutant ion channels.
- (ii) Interaction of protons with acidic residues in the pore region (E636 and D646) leads to decreased conductance of wild-type TRPV1 (Liu et al., 2009) and could possibly result in the inhibition of increased activity of mutant TRPV1 constructs.

In order to verify the first hypothesis, we prepared TRPV1 constructs with double mutations R455K/E600A and R455K/E648A in which the negative charge of glutamate residues is removed, and thus mimicking the protonated state of TRPV1 ion channel (Jordt et al., 2000). As in R455K single mutant, the two double mutants displayed slowed onset rate of the first capsaicin response and incomplete deactivation after capsaicin washout. Application of acidic pH resulted in the inhibition of the remaining current at least to the same extent as in TRPV1 channels with R455K mutation (Figure 5). These data indicate that the inhibitory effect of protons on the activity of the gain-of-function mutants is mediated by other pathways than the low-pH-induced stimulatory effects observed in wild-type TRPV1.

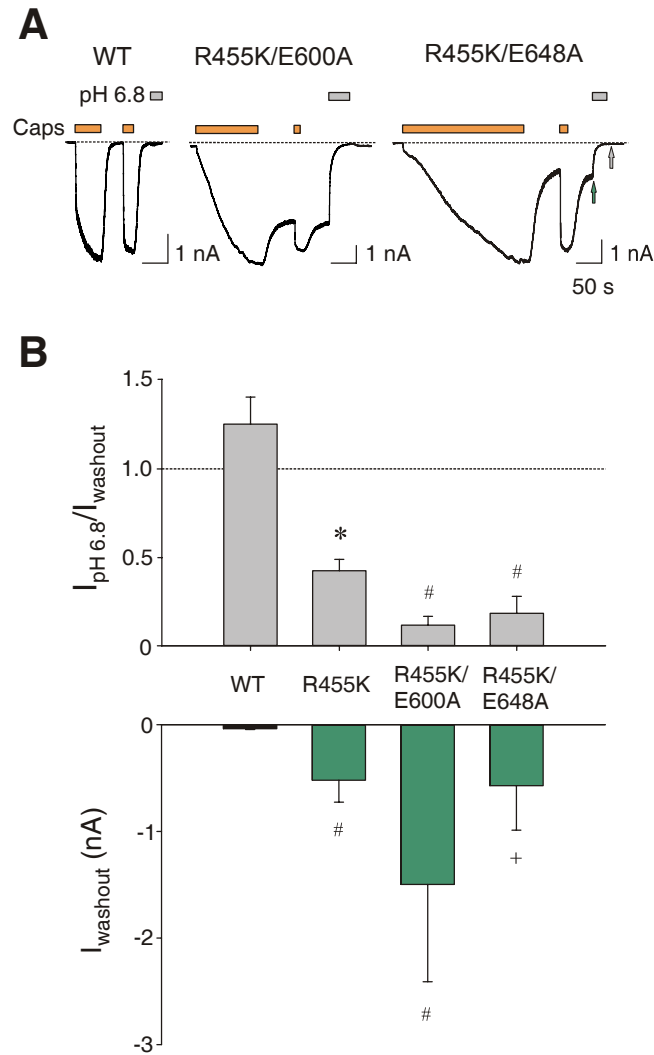


Figure 5. Acid sensors of TRPV1, E600 and E648, are not involved in proton-induced inhibitory effect. (A) Representative whole-cell current traces taken from HEK293T cell expressing wild-type TRPV1 or R455K/E600A and R455K/E648A double mutants in response to 1 μ M capsaicin and pH 6.8. (B) Quantification of inward current amplitudes after capsaicin washout (lower plot; time point is indicated by green arrow in panel A) and normalized current after application of pH 6.8 extracellular solution (upper plot; grey arrow in panel A; data were normalized to amplitudes after capsaicin washout)($n = 3-24$).

Protons are known to interact with the pore region of TRPV1. Protonation of two amino acid residues E636 and D646 in the pore mouth leads to decreased conductance of TRPV1 ion channel (Liu et al., 2009). In wild-type TRPV1, this inhibitory action of protons is masked by strong stimulatory effect of low pH on the activity of ion channel. We tried to elucidate the role of E636 and D646 in the inhibitory effect of protons observed in gain-of-function mutants using TRPV1 receptors with double mutations R557K/E636Q, R557K/D646N, G563S/E636Q and G563S/D646N. Unfortunately, E636 and D646N not only influenced conductance, but also gating properties (Liu et al., 2009) and their cooperation with gain-of-function mutations resulted in a severely disrupted TRPV1 phenotype, which we were not able to properly examine.

4.3 Desensitization effect of protons on the activity of TRPV1

In the course of our experiments we noticed that in wild-type TRPV1 the application of solution of low pH affects the kinetics of a subsequent capsaicin response – after stimulation with pH 5.5, the slow component of capsaicin-induced response was more prominent. In order to statistically evaluate the observed effect, we compared the onset rate of capsaicin responses before and after application of highly acidic extracellular solution (pH 4.0). After exposure to pH 4.0, the onset of capsaicin-evoked responses was markedly decelerated. However, subsequent capsaicin response was again much quicker (Figure 6). Thus, in wild-type TRPV1, the kinetics of capsaicin-induced responses after low pH stimulation is reminiscent of the phenotype of the gain-of-function mutants described above.

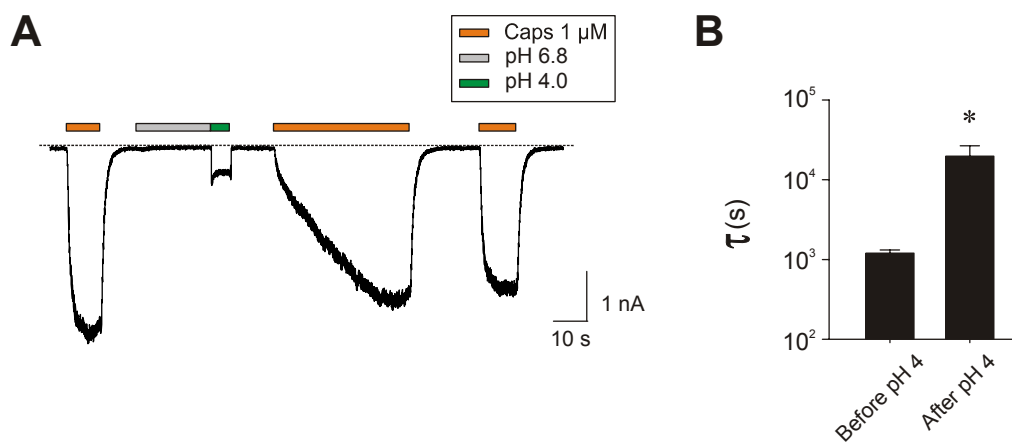


Figure 6. Low pH desensitizes wild-type TRPV1 ion channels. (A) Representative current responses of HEK293T cells expressing wild-type TRPV1 in response to 1 μ M capsaicin and low pH (pH 4.0). (B) Average time constants obtained from monoexponential fit of the onset of the capsaicin response before and after application of solution of pH 4.0 ($n = 7$).

4.4 The effect of epidermal growth factor on the activity of TRPV3 ion channels endogenously expressed in HaCaT cells

In order to evaluate the effect of epidermal growth factor on the activity of endogenous TRPV3 receptors, we compared the relative amplitudes of current responses of HaCaT cells stimulated by a mixture of TRPV3 agonists before and after application of EGF (Figure 7). After twelve minutes of incubation in 20 ng/ml EGF, the mean amplitude of agonist-evoked responses normalized to the maximal response was increased from 0.35 ± 0.02 to 0.72 ± 0.06 ($n = 6$). The prolonged incubation (27 minutes) did not lead to further increase in current amplitudes. In control experiments, when EGF was not added to the extracellular solution, the relative amplitude of responses increased with repeated application to 0.46 ± 0.03 ($n = 5$), which is significantly less than in HaCaT cells exposed to EGF. Our results indicate that short-term stimulation of HaCaT cells with EGF leads to sensitization of TRPV3 receptors.

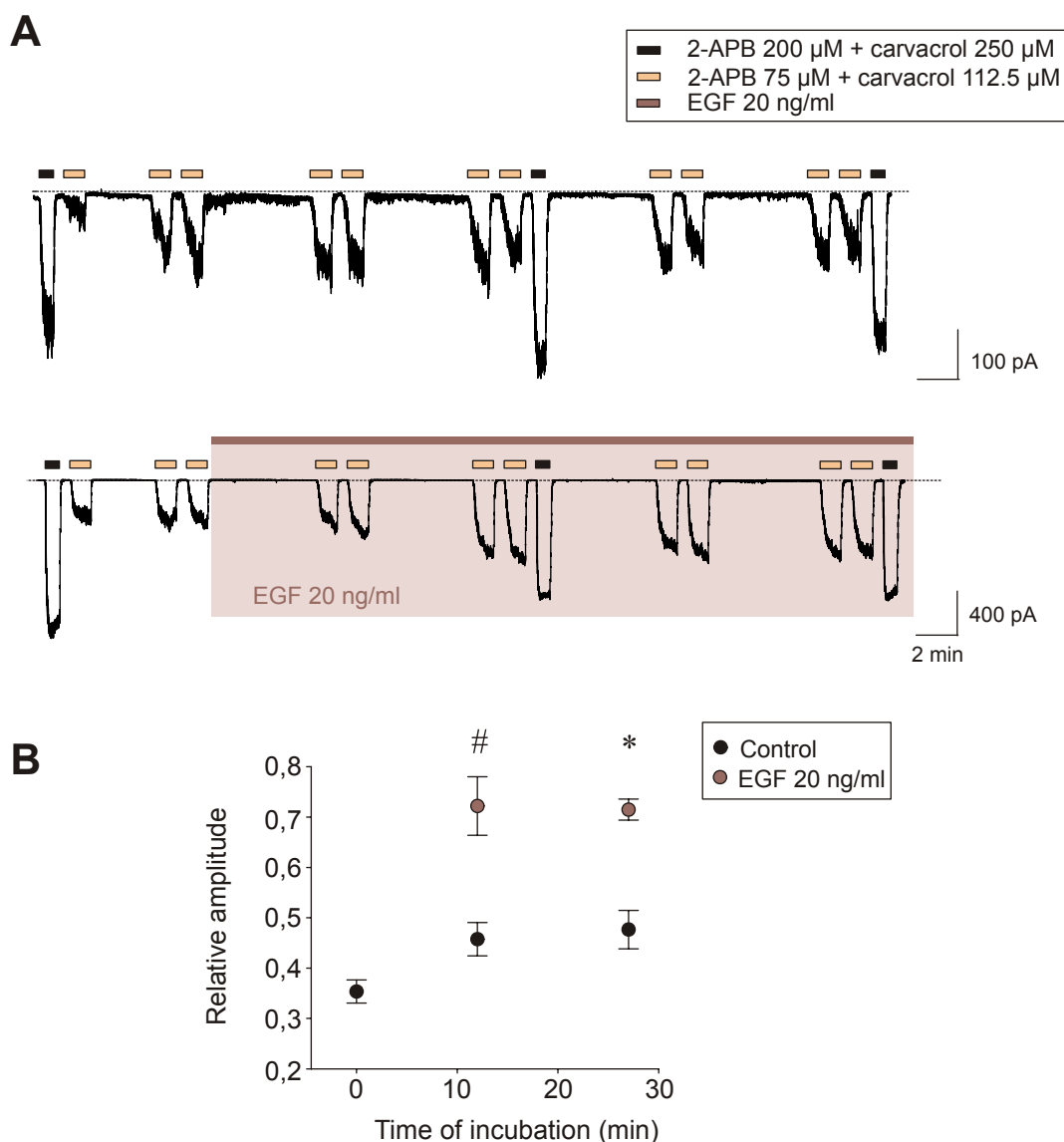


Figure 7. EGF sensitizes TRPV3 receptors endogenously expressed in HaCaT cells. (A) Sample recordings of the current responses of HaCaT cells evoked by chemical stimulation in control conditions (upper trace) and in the presence of EGF (lower trace). (B) Average amplitudes of responses induced by 75 μ M 2-APB in combination with 112.5 μ M carvacrol normalized to maximal response evoked by saturating concentration of agonists (200 μ M 2-APB + 250 μ M carvacrol) ($n \geq 5$).

The physiological effects of EGF are mediated by specific receptor with tyrosine kinase activity (EGFR) expressed on the membrane of target cells. Activation of EGFR triggers many signalling pathways, including mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade. Stimulation of MAPK pathway results in activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), which can phosphorylate and thus modulate the activity of many proteins in the cell.

To assess the role of MAPK pathway in EGF-mediated sensitization of TRPV3, we simultaneously applied EGF and inhibitors of this pathway – U0126 and PD98059 – on HaCaT cells. The two compounds block the function of mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2 (MEK1/2), which phosphorylate tyrosine and threonine residues on ERK required for activation. Addition of 10 μM U0126 or 30 μM PD98059 to the extracellular solution eliminated the potentiating effect of EGF on TRPV3-mediated responses (Figure 8). The sensitizing effect of EGF is thus suppressed by inhibition of MAPK pathway.

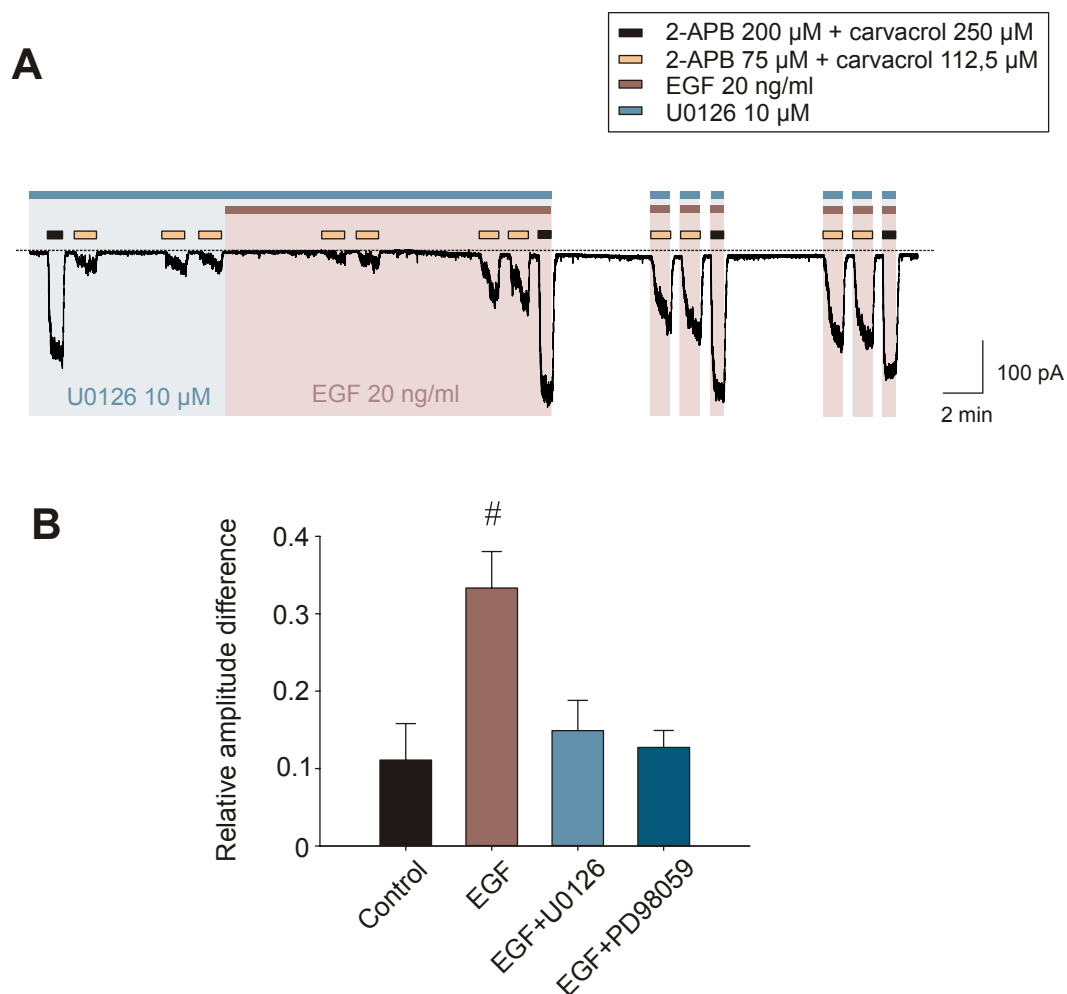


Figure 8. The sensitizing effect of EGF is suppressed by inhibition of MAPK pathway. (A) Representative recording of current responses of HaCaT cell stimulated by EGF in the presence of U0126 – inhibitor of MEK1/2. (B) Relative amplitude differences of responses elicited by 75 μM 2-APB in combination with 112.5 μM carvacrol at the beginning of recording and after 12 minutes of incubation in the presence of EGF. The normalized amplitudes of responses did not significantly increase in the presence of MAPK inhibitors – U0126 (10 μM) or PD98059 (30 μM)($n = 4-7$).

5 Discussion

5.1 Mutational analysis of the transmembrane region of the TRPV1 receptor

The aim of the first part of my Ph.D. thesis was to elucidate the importance of S1 transmembrane domain in TRPV1 function. We performed a systemic tryptophan-perturbation scan in this region to probe the orientation and structural basis of the ability to affect the activation kinetics of the channel. We identified six out of seventeen mutants that failed to generate currents in response to capsaicin, depolarizing voltage and low pH, indicating that the environment surrounding S1 is likely to have a significant impact on TRPV1 functioning. While we did not detect any clear periodicity in response to the mutant scan within the lower part of S1 (F439–I446), the effects of tryptophan mutations or other aromatic side-chain perturbation in the upper part of S1 (I447–R455) were clearly periodic, supporting the helical character of S1 and indicating that the face containing the affected residues is exposed to one environment more than the other and, presumably, involved in tight protein-protein interactions. A conservative mutation of arginine 455 in the upper part of S1 altered the functional properties of TRPV1 indicating the important role of this region in ion channel gating. In our search for possible interaction candidates, we looked at the negatively charged residues most likely to interact with R455 and excluded E458 and E478, located in the same TRPV1 subunit.

In K_v channels, the extracellular extent of S1 encompasses co-evolved residues that make physical contact with the pore helix over a small area near the extracellular membrane surface. It is believed that this interface may act as anchor point between the voltage sensor (S1–S4 domain) and the pore important for efficient transmission of conformational changes to the pore's gate (formed by S6)(Lee et al., 2009). Our results concerning the functional role of S1 indicate that analogous interaction between S1 and pore helix might serve to stabilize conformations associated with TRPV1 channel gating. Moreover, this hypothesis is supported by the fact that the functional properties of R455K mutation are strikingly similar to the phenotype of pore helix mutant T633A. Both mutants displayed slightly increased basal activity, enhanced voltage dependence and decreased temperature sensitivity. The responses of R455K and T633A to the first application of capsaicin were markedly slowed down and the deactivation after agonist washout was incomplete. Both mutants could not be activated by low pH; on the contrary, proton induced a rapid current deactivation.

In a recent study by ourselves, we described two overactive mutant TRPV1 ion channels with substitution in the fourth transmembrane segment and the S4–S5 linker (R557K and G563S), which were characterized by slowed kinetics of capsaicin-induced responses, incomplete deactivation after capsaicin washout and enhanced voltage sensitivity. To compare the phenotype of these mutants with that of R455K and G563S, we examined their sensitivity to low pH. The acidification of extracellular solution did not evoke any current increase in R557K and G563S constructs; on the contrary, the amplitude of the basal current was decreased. Similar to R455K and T633A mutants, the current remaining after capsaicin washout was in R557K and G563S constructs inhibited by mildly acidic pH. Our results indicate that mutations in distant areas of the TRPV1, such as extracellular part of S1, S4/S4–S5 region and pore helix, affect the functional properties of the ion channel in a similar way and disrupt all aspects of polymodal activation of TRPV1.

In the R455K, R557K, G563S and T633A gain-of-function mutants, the elimination of the stimulatory effect of protons could unmask the blocking effect of protons. Indeed, in these mutants, we observed a low pH-induced diminution of current amplitudes. Most pronouncedly, mildly acidic pH (pH 6.8) was able to reduce the elevated basal current of the

mutant ion channels after capsaicin washout by more than 50 %, which was accompanied by a decrease in signal noise. This effect was not readily reversible after restoring normal pH, indicating that the ion channels do not simply switch between the protonated and deprotonated conformation.

To test the hypothesis that the observed current deactivation is mediated by the same mechanism as the proton-induced decrease in unitary conductance, we wanted to investigate the functional properties of a triple-mutant TRPV1 with a combination of a gain-of-function mutation and the E636Q/D646N double mutation. Unfortunately, E636Q and D646N not only influenced conductance, but also gating properties (Welch et al., 2000; Liu et al., 2009) and their cooperation with the gain-of-function mutations resulted in a severely disrupted TRPV1 phenotype, which we were not able to properly examine.

Stimulatory effect of acidic solution on the activity of wild-type TRPV1 is mediated by protonation of two glutamate residues in the pore loop – E600 and E648 (Jordt et al., 2000). To examine the role of the two residues in the inhibitory effect of low pH, we determined the functional properties of double mutants R455K/E600A and R455K/E648A. Both constructs were characterized by incomplete deactivation after capsaicin washout. Application of acidic solution resulted in the inhibition of the remaining current at least to the same extent as in TRPV1 channels with R455K mutation, suggesting that the proton dependent inhibition of the constitutive activating mutation R455K does not depend on E600 and E648. Thus further experiments are needed to elucidate the mechanism of the inhibitory effect of protons on the activity of the gain-of-function TRPV1 mutants.

In R455K, R557K, G563S and T633A mutants we observed markedly slower onset of the first capsaicin response compared to wild-type; on the other hand, the kinetics of the onset of the second response to capsaicin was approximately the same or even faster than in wild-type TRPV1. In the overactive constructs, the current deactivation rate after removal of capsaicin was slowed down, which indicates that capsaicin binding may lead to destabilization of the closed conformation of the mutant channels. This conformational change may also result in increased remaining current after capsaicin washout.

We found that the gating of overactive constructs with mutation in the upper part of S1, S4/S4–S5 region and in the pore helix exhibits marked hysteresis. It seems that the mutant receptors may exist in two antagonistic conformational states, in which the closed conformation of the ion channel is stabilized or destabilized. The transition between the two states is mediated by application of low pH (stabilization of the closed state) or capsaicin (destabilization of the closed state). The question is whether the conformational changes are specific for the mutant ion channels, or whether the functional transitions are only more obvious in the overactive constructs compared to wild-type. The second option is supported by the fact that in wild-type TRPV1 and in Ca^{2+} -free conditions, the slow component of the first capsaicin-induced response represented significant portion of the whole inward current, while in the second capsaicin-evoked response was nearly absent. Moreover, we observed a marked deceleration of the onset of the capsaicin response in wild-type TRPV1 following the pre-application of a highly acidic solution of pH 4.0. This desensitizing effect of low pH on the activity of TRPV1 has not yet been described.

The conformational changes of TRPV1 receptors which are dependent on the duration of agonist application and agonist concentration have been discussed in the paper by Chung et al. (2008). They observed dynamic changes in ionic selectivity during agonist stimulation of TRPV1 which could arise as a consequence of progressive pore dilation. It was demonstrated that the changes in permeability are accompanied by conformational changes in the TRPV1 selectivity filter. Mutations in the pore region also affect the sensitivity of TRPV1 to capsaicin, even though the pore domain is not involved in capsaicin binding (Welch et al., 2000). The hysteresis of gating of R455K, R557K, G563S and T633A mutants could thus reflect the

dynamic changes in the structure of the pore domain. This hypothesis is supported by the fact that the mutations of the above constructs are located in regions which are in Kv channels important for transduction of the activation signal from voltage-sensing domain to the pore domain (Figure 9).

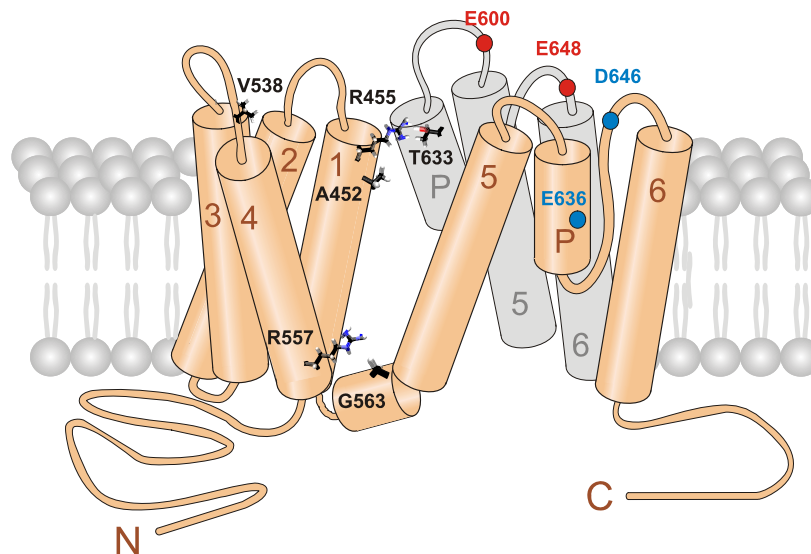


Figure 9. Cartoon model of TRPV1 subunit depicting those amino acid side chains which are important for sensitivity of ion channel to low pH. According to our hypothesis, the extracellular portion of S1 (comprising R455 and A452) and the pore helix (comprising T633) could form a functionally important contact surface between peripheral domain and the pore domain of neighbouring subunits. The putative proton binding sites are depicted in colour – red dots indicate residues important for the stimulatory effect of low pH (E600 and E648); blue dots represent the residues involved in the blocking effect of protons (E636 and D646).

5.2 Activation and modulation of TRPV3 receptors endogenously expressed in keratinocytes

We studied the acute effect of EGF on the activity of TRPV3 receptors endogenously expressed in a cell line of immortalized human keratinocytes HaCaT. We demonstrated that even short-term incubation of HaCaT cells in the presence of EGF leads to marked sensitization of TRPV3 ion channels. The observed effect of EGF was eliminated by adding inhibitors of the MAPK pathway, an important signalling cascade activated by the EGF receptor. Further experiments will be needed to determine the exact mechanism by which activation of MAPK pathway induce sensitization of TRPV3. One possibility is that TRPV3 receptors are directly phosphorylated by ERK, which has been previously shown to act on some ion channels (Schrader et al., 2006; Shen et al., 2011).

Recently it has been demonstrated that TRPV3 receptors play an important role in EGF and TGF- α signalling and are required for normal proliferation and differentiation of keratinocytes (Cheng et al., 2010). Our results contribute to an understanding of how are the EGF receptor and TRPV3 ion channels functionally coupled.

6 Conclusions

- We demonstrated that the extracellular portion of S1 plays an important role in TRPV1 channel gating. A positively charged residue at position 455 in this region is required for ion channel functionality.
- The phenotypic properties of TRPV1 constructs with mutation R455K in upper part of S1 and T633A in the pore helix regarding capsaicin-, low pH- and voltage-induced activity are similar to spontaneously active mutants with substitution in S4/S4–S5 region (R557K and G563S). In these mutants, the basal open-closed equilibrium is altered and the closed state is stabilized by lowering the pH of the extracellular solution. The inhibitory effect of protons is independent of extracellularly located proton sensing residues – E600 and E648.
- We demonstrated for the first time that protons stabilize the closed conformation of wild-type TRPV1. We assume that the mechanism of low pH-induced inhibition in wild-type and mutant ion channels is the same; however, in the overactive TRPV1 constructs the desensitizing effects of protons may be more noticeable due to their insensitivity to stimulatory action of low pH.
- Short-time incubation of HaCaT cells in the presence of EGF leads to sensitization of endogenous TRPV3 channels. After 12 minutes of EGF stimulation the mean relative amplitude of TRPV3-mediated responses was doubled.
- The modulatory effect of EGF is dependent on MAPK/ERK signalling. The EGF-induced sensitisation of TRPV3 receptors was abolished by the inhibitors of MAPK pathway, U0126 and PD98059, which block the activity of MEK1 and MEK2 required for the phosphorylation of ERK.

7 Použitá literatura/References

1. 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.
2. Asakawa M., Yoshioka T., Matsutani T., Hikita I., Suzuki M., Oshima I., Tsukahara K., Arimura A., Horikawa T., Hirasawa T., Sakata T. (2006) Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol* 126: 2664-2672.
3. 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: 19362-19371.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
9. Damann N., Voets T., Nilius B. (2008) TRPs in our senses. *Curr Biol* 18: R880-889.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Chung M.K., Guler A.D., Caterina M.J. (2008) TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11: 555-564.
16. 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.

17. 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.
18. Lin Z., Chen Q., Lee M., Cao X., Zhang J., Ma D., Chen L., Hu X., Wang H., Wang X., Zhang P., Liu X., Guan L., Tang Y., Yang H., Tu P., Bu D., Zhu X., Wang K., Li R., Yang Y. (2012) Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 558-564.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Nieto-Posadas A., Jara-Oseguera A., Rosenbaum T. (2011) TRP Channel Gating Physiology. *Curr Top Med Chem* 11: 2131-2150.
23. 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.
24. Ryu S., Liu B., Yao J., Fu Q., Qin F. (2007) Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci* 27: 12797-12807.
25. 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 kinase (MEK)-ERK1/2 signaling pathway. *J Biol Chem* 286: 19439-19445.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

8 Seznam publikací/Selected publications

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertační práce

a) s impakt faktorem

- 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)
- 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)

b) bez impakt faktoru

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

2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertační práce

- 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)

9 Curriculum vitae

Datum narození: 4.7.1986

E-mail: boukalova@biomed.cas.cz

Studium:

2005 – 2008 bakalářské studium, obor biologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
2008 – 2010 navazující magisterské studium, obor fyziologie živočichů, zaměření neurobiologie, PřF UK
od roku 2010 doktorské studium, studijní program Fyziologie živočichů, PřF UK
školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.
téma dizertační práce: Mechanizmy aktivace a modulace vaniloidních TRP receptorů

Kurzy:

2009 absolvování kvalifikačního kurzu pro VŠ pracovníky k získání způsobilosti dle §17, odst. 1 zákona 246/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů, na ochranu zvířat proti týrání v platném znění

Dosavadní odborná činnost:

Od roku 2007 Oddělení buněčné neurofyziologie, Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.
odborné zaměření: molekulární mechanismy vzniku bolesti
Rok 2011 čtyřměsíční stáž v laboratoři INSERM U.894 v Paříži zaměřená na studium mechanismů vzniku migrény

Pedagogická činnost:

2012 – 2013 výuka studentů v rámci týdenních kurzů pořádaných Centrem biomedicínského výzkumu na Fyziologickém ústavu AV ČR

Grantová činnost:

Studentka byla hlavní řešitelkou projektů podporovaných Grantovou agenturou UK:

- GAUK 49709/2009: Účinek tramadolu na aktivitu teplotlivých TRP iontových kanálů účastnících se přenosu bolestivých podnětů
- GAUK 26110/2010: Strukturální determinanty polymodální aktivace vaniloidních receptorů
- GAUK 500512/2012: Mechanismus inhibičního působení protonů na aktivitu teplotně citlivých TRP receptorů

Ocenění

- Cena Vyklického:
Prvoautorská publikace studentky s názvem „Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive TRPV channels“ byla oceněna Společností pro studium a léčbu bolesti ČSL JEP

Curriculum vitae

Date of birth: 4/7/1986

E-mail: boukalova@biomed.cas.cz

Education:

2005 – 2008 Bachelor's degree study, programme biology, the Faculty of Science, Charles University in Prague (FS CU)
2008 – 2010 Master's degree study, programme animal physiology, FS CU
since 2010 Ph.D. study, programme animal physiology, FS CU
Supervisor: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.
Ph.D. thesis: Mechanisms of activation and modulation of vanilloid TRP channels

Practical courses:

2009 Training course for animal protection law enforcement

Research experience:

since 2007 Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic
Topic of research: Molecular mechanisms of pain
Feb.–May Research fellowship in laboratory INSERM U.894 in Paris
2011 Topic of research: Migraine mechanisms

Pedagogical activities:

2012 – 2013 Participation in courses held by Biomedical Research Center, Institute of Physiology, AS CR

Grant activities:

Projects supported by the Grant Agency of the Charles University:

- *GAUK 49709/2009*: The effects of tramadol on the activity of thermosensitive TRP ion channels involved in pain pathway
- *GAUK 26110/2010*: Structural determinants of polymodal activation of vanilloid receptors
- *GAUK 500512/2012*: Mechanisms of proton-induced inhibition of thermosensitive TRP receptors

Awards:

- Vyklicky award:
First-author publication "*Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive TRPV channels*" was awarded by Czech Medical Association of J. E. Purkyně