

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



Autoreferát disertační práce

**Modulační mechanismy nociceptivních TRP kanálů**

Modulatory mechanisms of nociceptive TRP channels

**Lenka Maršáková**

Praha, 2012

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Program:	Fyziologie živočichů
Předseda oborové rady:	Doc. RNDr. Stanislav Vybíral., CSc.
Školicí pracoviště:	Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Oddělení buněčné neurofyziologie
Autor:	Mgr. Lenka Maršáková
Školitel:	RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.
Konzultant:	RNDr. Jan Krůšek, Ph.D.

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

## **OBSAH/CONTENT**

1. SOUHRN .....	4
2. ÚVOD .....	5
3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	7
4. MATERIÁL A METODIKA .....	8
5. VÝSLEDKY .....	10
6. DISKUZE.....	16
7. ZÁVĚR.....	19
1. SUMMARY .....	21
2. INTRODUCTION.....	22
3. AIMS OF THE STUDY .....	23
4. MATERIALS AND METHODS.....	24
5. RESULTS.....	26
6. DISCUSSION .....	32
7. CONCLUSIONS .....	35
8. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES .....	36
9. SEZNAM PUBLIKACÍ/SELECTED PUBLICATIONS	39
10. CURRICULUM VITAE.....	40

# 1. SOUHRN

Detekce bolestivých podnětů na periférii a jejich transdukce do CNS je zprostředkována některými zástupci teplotně citlivých transient receptor potential (TRP) kanálů, kteří se exprimují na volných zakončeních primárních aferentních senzoričtých neuronů nazývaných nociceptory. Prostřednictvím TRP kanálů nociceptory vnímají nejen teplotní stimuly, ale také podněty mechanické a chemické. Ze sedmi v současnosti identifikovaných teplotně citlivých TRP kanálů jsou za detekci bolestivých teplotních podnětů zodpovědní dva teplem aktivovaní zástupci vaniloidních receptorů: TRPV1 ( $\geq 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), TRPV2 ( $\geq 52\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a jeden chladem aktivovaný zástupce ankyrinových receptorů TRPA1 ( $\leq 17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tyto kanály jsou typické složitým a dosud neznámým mechanismem působení, jejichž poznání je nezbytné k pochopení jejich komplexních funkcí v organismu a následně pro navrhování potenciálních analgetik. Nové poznatky, které jsou náplní této studie, směřují k objasnění mechanismů působení dvou výše zmíněných nociceptivních receptorů TRPV1 a TRPA1, se zaměřením na kastrovou a napěťovou citlivost TRPV1 a vápníkovou modulaci TRPA1 receptoru.

Prvním tématem, které je v této práci diskutováno, je modulační mechanismus kafru na TRPV1 receptor. Kafr je účinnou, v přírodě se vyskytující látkou používanou díky svým analgetickým účinkům od nepaměti. Její mechanismus působení je však neznámý. Kafr je znám jako parciální agonista TRPV1 receptoru, plný agonista TRPV3 receptoru, ale i jako inhibitor savčího receptoru TRPA1. Působení kafru bylo v rámci této studie studováno nejen na úrovni vaniloidního receptoru typu 1, ale i na úrovni změn vlastností membrány v přítomnosti této látky. Ukázalo se, že kafr je schopen velmi rychle aktivovat TRPV1 receptor, a to prostřednictvím konformační změny krátkého helixu, který je situován uvnitř póru kanálu. Tento helix byl navržen i jako místo interakce kafru s receptorem. Stejně dobře kafr mění distribuci důležitého modulátoru vaniloidního receptoru fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu na vnitřním listu membrány, což může představovat důležitý způsob modulace membránových receptorů.

Z hlediska základních strukturálně funkčních vlastností byla u TRPV1 receptoru studována úloha intracelulární části S4-S5 helixů a byla porovnána funkce odpovídajících aminokyselin u dvou dalších zástupců vaniloidních receptorů, TRPV2 a TRPV3. Přestože je studovaná oblast mezi těmito zástupci vysoce konzervovaná, ukázalo se, že nabitá rezidua v této oblasti mají mezi jednotlivými zástupci odlišné funkce v jejich teplotní, napěťové a chemické citlivosti. Byla identifikována rezidua nezbytná pro napěťovou a teplotní modulaci kapsaicinem aktivovaného TRPV1 kanálu.

Závěrečným tématem diskutovaným v rámci této práce je úloha distální části C-terminálního konce TRPA1 receptoru v aktivaci vápenatými ionty.

TRPA1 je iontový kanál, jehož funkce je silně modulovaná ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , ale mechanismus této modulace nebyl zatím uspokojivě objasněn. Na základě našich experimentálních dat usuzujeme na funkci distální domény C-konce jako vápníkového senzoru TRPA1 receptoru. Záměnami kyselých aminokyselin v této oblasti byla prokázána úloha těchto reziduí ve  $\text{Ca}^{2+}$ -indukované potenciaci a inaktivaci tohoto kanálu. Výsledky této části předložené dizertační práce napomáhají k porozumění funkce TRPA1 receptoru v chemické nocicepci.

## 2. ÚVOD

TRP kanály představují jednu z největších a evolučně původních rodin iontových kanálů, jejíž zástupci jsou exprimováni téměř ve všech typech živočišných tkání. V primárních senzorych neuronech plní úlohu transdukčních molekul, které na nervovém zakončení umožňují detekovat celou řadu vnějších podnětů, rozpoznat mezi nimi podněty škodlivé a neškodné a předat tuto informaci do centrální nervové soustavy. Určení intenzity a modality aktivačního podnětu nezávisí pouze na počtu exprimovaných receptorů, ale především na typu přítomných TRP receptorů. Polymodální TRPV1 a TRPA1 receptory jsou klíčovými molekulami, které na primárních senzorych neuronech zajišťují detekci podnětů, jež vyvolávají u člověka bolest a pravděpodobně se uplatňují v mechanismech chemické, tepelné a mechanické nocicepce za fyziologických i patofyziologických podmínek. Sedm z celkem 30 identifikovaných savčích zástupců TRP kanálů je aktivováno při překročení určitého teplotního prahu. Vaniloidní zástupci TRPV1-4 převádějí informaci o zvýšené (TRPV3 a TRPV4) až bolestivé (TRPV1 a TRPV2) teplotě okolního prostředí (Caterina et al., 1999, Caterina et al., 1997, Peier et al., 2002, Xu et al., 2002). Naproti tomu TRPM8, TRPC5 a TRPA1 kanály jsou aktivovány mírným chladem, nebo chladem vyvolávajícím bolest (McKemy et al., 2002, Peier et al., 2002, Story et al., 2003, Zimmermann et al., 2011).

V současné době je vynakládáno velké úsilí na vývoj antagonistů především TRPV1 a TRPA1 receptorů, neboť blokátory těchto kanálů mohou představovat terapeutické využití jako analgetika. Účinnou alternativou ve vývoji nových analgetik může být řízení modulace iontových kanálů zánětlivými mediátory, neboť práh teplotní aktivace TRPV1 i TRPA1 je modulován extracelulárními mediátory poškození tkáně či zánětu (např. bradykinin, prostaglandiny, růstové faktory). K celkovému porozumění fyziologické funkce TRP receptorů dosud brání neznalost detailní struktury, nedostatečná informace o místech funkční exprese a nedostatečná selektivita jejich aktivátorů a inhibitorů. Údaje z dosavadních studií potvrzují, že funkční TRP kanál je tetramerem, jehož každá z podjednotek je tvořena šesti transmembránovými průniky (S1-S6) spojenými extra- a intracelulárními kličkami, z karboxylového a aminového konce směřujícími do cytoplazmy (Clapham, 2003). Mezi S5 a S6 doménou je lokalizována krátká hydrofobní

klička („*P-loop*“), která společně s identickými částmi dalších tří podjednotek vytváří selektivní filtr a centrální pór kanálu, jímž ve směru elektrochemického gradientu procházejí kationty (Li et al., 2011, Owsianik et al., 2006). TRPV1 je aktivován celou řadou podnětů chemické a fyzikální povahy, endogenního i exogenního původu, sloučeninami přírodními i syntetickými. Řada z těchto podnětů, jako například teplo ( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $\text{pH} < 6$ , látky uvolněné v místě poranění či zánětu, jsou prostřednictvím aktivace TRPV1 zdrojem bolestivého vjemu, který chrání daný organizmus za normálního i patologického stavu. Mezi aktivátory rostlinného původu s analgetickým účinkem patří kafr, který byl charakterizován jako částečný agonista TRPV1 receptoru, který je schopen jeho aktivace nezávisle na vazebném místě pro vaniloidní látky (Xu et al., 2005). Tato látka je díky svým analgetickým účinkům běžně používána, ale její molekulární mechanismus působení znám není.

Významným modulátorem TRPV1 receptoru je fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( $\text{PIP}_2$ ). Výsledky studií zabývajících se účinkem  $\text{PIP}_2$  na TRPV1 jsou však často kontroverzní. Z dosavadních studií vyplývá, že tento kyselý fosfolipid je schopen inhibice i senzitivace TRPV1 receptoru, a to pravděpodobně prostřednictvím přímých a/nebo nepřímých mechanismů v závislosti na koncentraci agonisty (Lukacs et al., 2007). Při saturující koncentraci kapsaicinu ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ) a v přítomnosti extracelulárního vápníku  $\text{PIP}_2$  aktivuje TRPV1 receptor, neboť po jeho depleci vyvolané aktivací PLC receptor desenzitivuje. Naopak, při nízké koncentraci kapsaicinu ( $1\text{ nM}$ ) převládá inhibiční efekt  $\text{PIP}_2$ . V souladu s jinými studiemi autoři této publikace tvrdí, že  $\text{PIP}_2$  je agonistou TRPV1 receptoru, jehož aplikací na vytržené terčíky je možné vyvolat aktivaci iontového kanálu (Klein et al., 2008, Klein et al., 2008, Klein et al., 2011, Lukacs et al., 2007, Stein et al., 2006).

TRPV1 kanál je ve srovnání s napětím aktivovanými  $\text{K}^+$  kanály jen slabě napětově závislý. Aktivace depolarizujícím napětím je charakterizována hodnotou polovičního účinného napětí  $V_{1/2} \sim +154\text{ mV}$  (Boukalova et al., 2010). Hodnota  $V_{1/2}$  je silně závislá na teplotě. Při vyšší teplotě se práh napětové citlivosti TRPV1 výrazně posouvá k více negativním potenciálům (Nilius et al., 2005, Voets et al., 2004). To znamená, že citlivost tohoto teplotního senzoru je závislá na membránovém potenciálu a lze tedy očekávat, že se bude lišit u různých typů excitabilních buněk. Napětová závislost TRPV1 receptoru se mění také v přítomnosti dalších aktivátorů. Například TRPV1 je při pokojové teplotě aktivován depolarizujícím napětím, ale v přítomnosti kapsaicinu je aktivován více při hyperpolarizačním potenciálu. Křivka pravděpodobnosti otevření vs. koncentrace kapsaicinu má všechny znaky kooperativního aktivačního mechanismu (Oseguera et al., 2007). Předpokládá se tedy, že aktivační dráha kapsaicinu je alostericky spojena s dráhou napětovou a teplotní.

Aktivita TRPA1 kanálu je významným způsobem modulována vápenatými ionty. Kromě náboje, který s sebou při průchodu kanálem nesou, je to především jejich schopnost aktivace a následné inhibice proudové odpovědi

na chemický podnět.  $\text{Ca}^{2+}$  ionty určují míru aktivace TRPA1 tím, že ovlivňují jednotkovou vodivost a pravděpodobnost otevření kanálu (Nagata et al., 2005). Vápenaté ionty mohou interagovat s TRPA1 prostřednictvím vazebné domény tzv. „*EF hand*“ na aminovém konci receptoru (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007). Kromě přímé aktivace mají  $\text{Ca}^{2+}$  ionty zásadní úlohu v modulaci aktivity ankyrinového receptoru. Jejich účinek spočívá v potenciaci a následné inhibici odpovědi vyvolané agonistou, přičemž oba děje jsou pravděpodobně na sobě nezávislé (Sura et al., 2012, Wang et al., 2008).

### 3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

#### Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

Kafr je parciálním agonistou TRPV1 receptoru, jehož mechanismus účinku je nezávislý na vazebném místě pro vaniloidní sloučeniny. Na základě zjištění, že kinetika kafrových odpovědí TRPV1 receptoru je rychlá, jsme předpokládali, že se jedná o přímou interakci s receptorem, pravděpodobně z extracelulární strany. Kafr je mimo jiné lipofilní látkou používanou ve vysokých koncentracích a nelze proto opomenout ani možnost jeho nepřímého účinku na receptor prostřednictvím významného modulátoru TRPV1 receptoru  $\text{PIP}_2$ .

#### **Cíle:**

- A) Pomocí elektrofyziologických experimentů popsat základní kinetické charakteristiky kafrových odpovědí TRPV1 a porovnat je s odpověďmi klasického agonisty kapsaicinu.
- B) Popsat kafrovou modulaci TRPV1 membránových proudů vyvolaných charakteristickými aktivátory, jako jsou kapsaicin, teplo, depolarizační napětí a protony.
- C) Navrhnout možný mechanismus kafrové modulace TRPV1 receptoru, popřípadě navrhnout místo interakce kafru s receptorem.
- D) Na základě FRET experimentů popsat dynamiku molekul  $\text{PIP}_2$  v membráně v přítomnosti kafru a porovnat ji se změnou distribuce tohoto fosfolipidu v přítomnosti kapsaicinu. Navrhnout funkci  $\text{PIP}_2$  v kafrové modulaci TRPV1.

#### Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

Intracelulární část S4-S5 helixů představuje mezi teplotně citlivými vaniloidními zástupci (TRPV1, TRPV2 a TRPV3) TRP receptorů vysoce konzervovanou oblast s nabitými rezidui, která by mohla být významná pro funkci těchto receptorů a stejně jako u příbuzného TRPM8 kanálu představovat součást jeho napěťového senzoru.

**Cíle:**

- A) Připravit mutantní receptory s neutralizujícími záměnami postupně všech nabitých aminokyselin v S4-S5 oblasti TRPV1. Elektrofyziologicky charakterizovat jejich citlivost na depolarizační napětí a chemickou citlivost na kapsaicin. U reziduí, které budou mít rozdílný fenotyp na sledovaný podnět od divokého typu receptoru, navrhnout jejich funkční a strukturální význam.

**Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca<sup>2+</sup> aktivaci**

Distální část karboxylového konce TRPA1 obsahuje oblast bohatou na záporně nabitě aminokyseliny, která by mohla představovat potenciální místo pro jeho vápníkovou modulaci.

**Cíle:**

- A) Funkčním testováním konstruktů TRPA1 receptoru se zkrácenými C-konci zjistit význam této části receptoru v jeho funkci.
- B) Příprava a funkční testování jednotlivých mutací v oblasti distálního C-konce TRPA1 bohaté na záporně nabitá rezidua (E<sup>1073</sup>I ISETEDDD<sup>1082</sup>). Určení fenotypu jednotlivých mutantů TRPA1 receptoru testovaných na citlivost k depolarizačnímu napětí, cinamalu a vápníkovou potenciací a inhibici cinamalem vyvolané odpovědi.
- C) S využitím homologního modelování a molekulárně dynamické simulace ověřit možné interakce testovaných reziduí s ionty vápníku.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

***Expresní systém a konstrukty***

V experimentech byla používána krysí (poskytnuta od David Julius, USA) a lidská varianta divokého TRPV1 receptoru (Origene Technologies, USA), lidská varianta TRPV2 (Origene Technologies, USA), TRPV3 (poskytnuta od Ardem Patapoutian, USA) a TRPA1 receptoru (Origene Technologies, USA) a jejich mutantní varianty připravené pomocí kitu QuikChange II XL Site-Directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, USA). Dále chiméra krysího TRPV1 receptoru s TRPV2 receptorem (TRPV1-Δ15:627-634). K dispozici byla i kontrolní varianta této chiméry s delecí 15 aminokyselin (TRPV1-Δ15). Klony byly poskytnuty laboratoří doktora Feng Qin v Buffalu (Ryu et al., 2007). Ke studiu změn distribuce PIP<sub>2</sub> v membráně pomocí FRET techniky bylo využito dvojice CFP- (modrý fluorescenční protein) a YFP- (žlutý fluorescenční protein) značených PH („pleckstrin homology“) domén, které specificky vážou molekulu PIP<sub>2</sub> (PH\_CFP a PH\_YFP) (poskytnuty od Tamas Balla, USA).

Jako expresní systém byly využívány lidské embryonální ledvinné buňky HEK293T (ATCC, USA). Buňky byly pěstovány v médiu OPTI-MEM (Life Technologies, USA) obohaceném 5% fetálním telecím sérem (PAN Biotech



GmbH, Aidenbach, Německo) v inkubátoru při teplotě 37 °C, 5% koncentraci CO<sub>2</sub>. Plazmidy (200-600 ng), byly přechodně transfekovány do HEK293T buněk pomocí magnetických nanoparticulí MATra-A Reagent a silného magnetu (IBA GmbH, Německo). Transfekované buňky byly v rozmezí 24-48 hodin použity k experimentům. Pro rozeznání buněk exprimujících rekombinantní receptory od buněk netransfekovaných byla používána kotransfekce receptorů se zeleným fluorescenčním proteinem GFP (150 ng).

### ***Elektrofyzilogická měření***

Membránové proudy z HEK293T buněk byly snímány pomocí elektrofyziologické techniky terčíkového zámku („*patch clamp*“). Proudly byly měřeny z celých buněk zesilovačem Axopatch 200B (Axon Instruments, USA) a programem pCLAMP 10 (Molecular Devices, USA). Snímací pipety byly vytaženy z borosilikátových kapilár o vnějším průměrem 1.65 mm pomocí tahače (P-97, Sutter Instrument, CA). Snímací pipety byly naplněné intracelulárním roztokem o pH = 7.3 a osmolaritě 290 mmol/kg obsahující: 125 mM glukono- $\delta$ -lakton, 15 mM CsCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> a 2 mM ATP (Mg<sup>2+</sup> sůl). Veškeré experimenty mimo experimenty s teplotní stimulací probíhaly při pokojové teplotě (23-25 °C) a membránový potenciál buněk (pokud není uvedeno jinak) byl udržován na -70 mV. Sériový odpor byl u všech buněk kompenzován minimálně na 70 %. V případě měření mutantních receptorů byl vždy stejnými roztoky a protokolem otestován i divoký typ receptoru (WT) na buňkách stejné pasáže. Pro daný typ experimentu byly provedeny nejméně čtyři nezávislé transfekce. Na každý pokus bylo použito vždy nové krycí sklíčko s buňkami. Transfekované buňky byly vizualizovány pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX-81 (Olympus, Japonsko) excitací GFP při 475  $\pm$  10 nm a snímáním emise při vlnových délkách > 510 nm. Pro definovanou aplikaci chemických látek byl používán aplikační systém WAS02 s možností rychlé výměny až sedmi roztoků v čase kratším než 130 ms. Toto aplikační zařízení bylo rozšířeno o možnost přesného řízení teploty roztoku (Dittert et al., 2006, Dittert et al., 1998). V průběhu fluorescenčních a elektrofyziologických experimentů byly buňky omývány extracelulárním roztokem o pH = 7.3 a osmolaritě 325 mmol/kg obsahující: 160 mM NaCl, 10 mM glukosy, 10 mM HEPES, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> a 2 mM MgCl<sub>2</sub>.

### ***Fluorescenční měření***

K monitorování dynamiky PIP<sub>2</sub> jsme využili metody založené na rezonančním přenosu energie mezi dvěma fluorofory („Förster resonance energy transfer“ - FRET). Princip této metody je podrobně popsán v publikaci (van der Wal et al., 2001). CFP byl excitován při 436  $\pm$  10 nm a jeho emise snímána při 480  $\pm$  15 nm. Emisní spektrum CFP se překrývá s excitačním spektrem YFP, jehož emise byla detekována při 535  $\pm$  20 nm ( $\lambda_{excitace}$  = 470  $\pm$

10 nm). Fluorescenční pokusy byly zaznamenávány pomocí programu Cell<sup>^</sup>R a invertovaného mikroskopu Olympus IX-81 (Olympus, Tokyo, Japonsko) vybaveného speciálním zařízením pro současné snímání emise při dvou různých vlnových délkách (Dual-View Optical Insights, LLC, USA). Nezbytnou součástí aparatury tvořil polychromátor (Polychrome V, Till Photonics, Německo), který je schopen rychle měnit vlnové délky excitace, a citlivá CCD kamera (Hamamatsu Orca ER; Japonsko). K vyhodnocení fluorescenčních experimentů byl využit program ImageJ v kombinaci s programem SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Německo). Ke grafické prezentaci výsledků byl použit CorelDRAW 12 (Corel Corporation, Kanada).

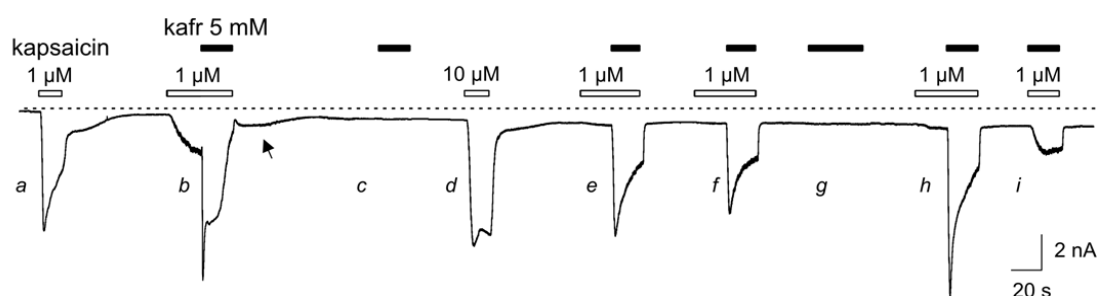
### **Statistické vyhodnocení**

Elektrofyzilogická data byla analyzována programem pCLAMP 10 (Molecular Devices GmbH, Německo) a křivky byly prokládány a statisticky analyzovány v programu SigmaPlot 10 a SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., USA). Získané výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  střední chyba nebo odchylka průměru (S.E. nebo SD), statistická významnost byla vypočtena pomocí t-testu. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hladinou významnosti  $P < 0.05$ .

## **5. VÝSLEDKY**

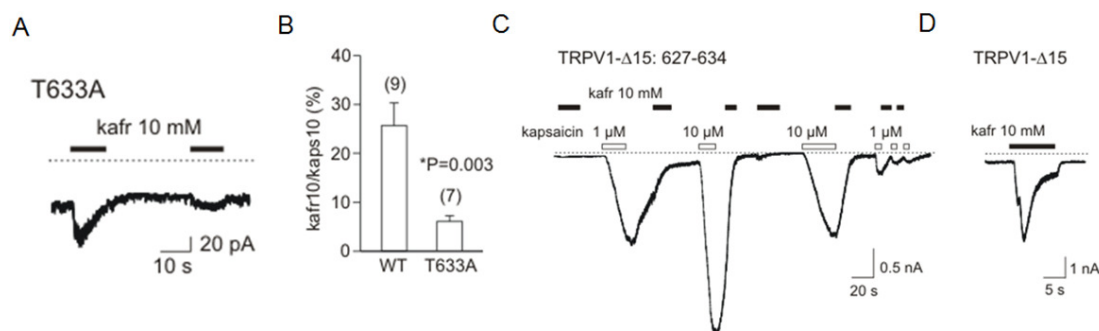
### **Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál**

Při charakterizaci kafrových odpovědí jsme zjistili, že kafr aktivuje TRPV1 receptor koncentračně závislým způsobem s hodnotou  $EC_{50} \sim 5$  mM na membránovém potenciálu +70 mV. Rychlá kinetika aktivace, deaktivace kafrových odpovědí TRPV1 receptoru a úplná vratnost kafrem zprostředkované potenciace kapsaicinových odpovědí (obr. 1) podporuje hypotézu, že kafr aktivuje TRPV1 kanál prostřednictvím přímé interakce. Opakovatelná potenciace kapsaicinem vyvolaných odpovědí kafrem je stavově závislá resp. dochází k ní pouze pokud je TRPV1 receptor obsazen molekulami kapsaicinu. Účinek kafru na TRPV1 výrazně vzroste synergistickým působením dalších modalit, jako je teplo, kapsaicin či depolarizační napětí. Membránové proudy zprostředkované TRPV1 kanály vyvolané nízkým pH (pH = 6.8) jsou však kafrem potencovány jen mírně.



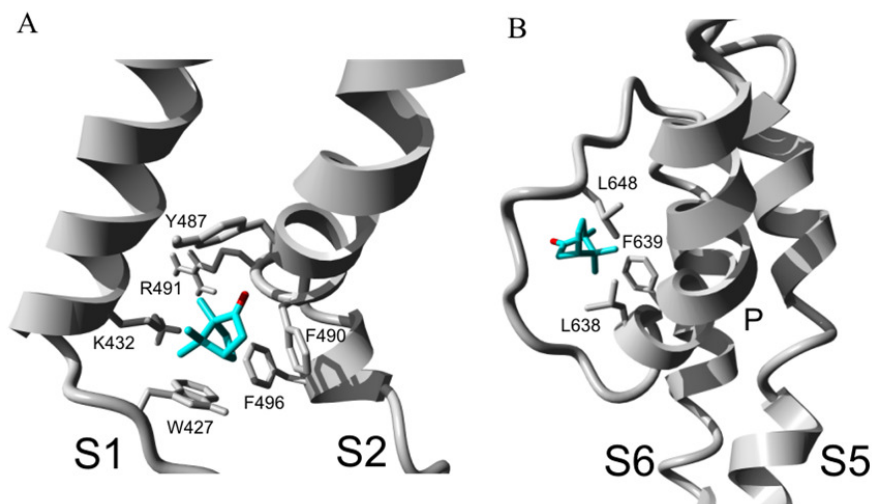
**Obr. 1: Kafrem vyvolaná stavově závislá potenciace kapsaicinové odpovědi TRPV1.** Reprezentativní záznam proudových odpovědí z celé buňky (HEK293T), exprimující TRPV1 kanály, udržované na membránovém potenciálu -70 mV. Přerušovaná čára představuje nulovou úroveň proudu. Aplikace roztoků s 1 a 10  $\mu$ M kapsaicinem (bílé obdélníky; a, d), 5 mM kafrem (černé obdélníky; c, g) či jejich kombinace (b,e,f,h,i) odhalují, že kafr potencuje kapsaicinem vyvolané odpovědi mnohem efektivněji, pokud je receptor obsazen kapsaicinem, než v případě zavřené formy receptoru (b, e, f, h vs. i), a to i v případě, že kafr sám již žádnou odpověď nevyvolá (c, g).

Ověřovali jsme proto hypotézu, že by aktivační dráha pro kafr mohla být částečně společná s dráhou pro protony. Záměnou threoninu 633 - nezbytného pro aktivaci TRPV1 protony - za alanin, jsme získali mutantní receptor, u kterého se amplituda kafrem vyvolané proudové odpovědi na membránovém potenciálu -70 mV snížila o 94 % (obr. 2A,B). Mutant měl současně v plném rozsahu zachovánu citlivost na kapsaicin. Tento výsledek nás vedl k hypotéze, že T633 je nezbytný nejen pro aktivaci TRPV1 protony, ale uplatňuje se také při převodu signálu interakce receptoru s kafrem. Abychom zjistili význam celého pórového helixu obsahující T633 pro převod kafrové signalizace, použili jsme chiméru TRPV1 receptoru (Ryu et al., 2007), která měla oblast pórového helixu (Y627-C634) vyměněnu za odpovídající část TRPV2 receptoru, který je na kafr necitlivý. U této chiméry (TRPV1- $\Delta$ 15:627-634) došlo k úplné ztrátě citlivosti na kafr (obr. 2C), což je silným důkazem toho, že zaměněná oblast je nezbytná pro zprostředkování kafrové odpovědi. Chiméra se kromě vyměněné pórové části receptoru od divokého typu receptoru lišila delecí patnácti ( $\Delta$ 15:T612-S626) nekonzervovaných aminokyselin v kličce spojující S5 doménu s pórovým helixem. Z tohoto důvodu jsme také testovali kontrolní chiméru s delecí zmíněných patnácti aminokyselin (TRPV1- $\Delta$ 15) a experimentálně jsme vyvrátili možnost, že by tato část měla nějakou funkci v kafrové citlivosti TRPV1 receptoru, či že by se chiméra funkčně odlišovala od TRPV1- $\Delta$ 15:627-634 chiméry (obr. 2D). Ve shodě s předešlou studií (Ryu et al., 2007) naše výsledky ukázaly, že elektrofyziologická odpověď zmiňované chiméry (TRPV1- $\Delta$ 15:627-634) je typická zpomalenou aktivační a deaktivací kinetikou, avšak plně zachovává maximální amplitudu kapsaicinové odpovědi. Nelze tedy říci, že by pozorovaný fenotyp chiméry byl odrazem nefunkčního kanálu. Zjistili jsme, že chimerický typ kanálu je necitlivý nejen na kyselé pH (pH = 6.8), jak již bylo popsáno dříve (Ryu et al., 2007), ale především na kafr a na rozdíl od mutantu T633A překvapivě i na depolarizující napětí. Tyto údaje podporují hypotézu o úloze pórového helixu jako společného elementu pro otevírání a zavírání iontového kanálu v přítomnosti různých aktivačních modalit (Myers et al., 2008).



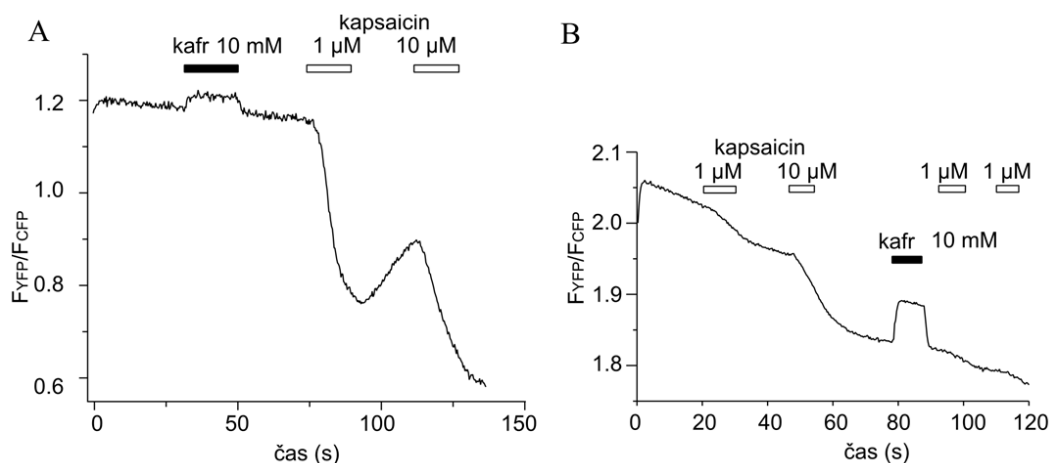
**Obr. 2: Pórový helix hraje klíčovou úlohu v kافrové citlivosti TRPV1 receptoru.** A, Substituce threoninu 633 za alanin významně redukuje kافrem vyvolané odpovědi. B, Kvantifikace proudové hustoty v maximální amplitudě vyvolané roztokem 10 mM kافru pro WT a T633A mutant. C, TRPV1 chiméra je kompletně necitlivá na kافr, kافr u ní není schopen vyvolat ani potenciaci kافsaicinové odpovědi, chiméra je charakteristická pomalým nástupem aktivace i deaktivace kافsaicinové odpovědi. D, Delece 15 nekonzervovaných reziduí před pórovým helixem ( $\Delta 15$ ), které chybí u měřené chiméry, nemají vliv na kافrovou citlivost TRPV1. Buňky byly udržovány na membránovém potenciálu  $-70$  mV; čísla v závorkách znázorňují počet naměřených buněk; v případě B data představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD.

Dokovací experimenty ukázaly na dvě pravděpodobná místa interakce kافru s receptorem: oblast pórového helixu mezi S5-S6 (obr. 3B; L638, L648 a F639) a intracelulární oblast mezi S1-S2 helixy (obr. 3A; W427, K432, Y487, R491, F490 a F496). První predikované místo - vnější pór iontového kanálu - je v souladu s funkčním testováním této oblasti (viz chiméra) a představuje tak pravděpodobné místo interakce kافru s TRPV1 receptorem.



**Obr. 3: Predikce vazebného místa pro kافr na TRPV1 receptoru.** A, První predikci určené vazebné místo pro kافr je lokalizované na rozhraní lipidové vrstvy a intracelulární části S1 a S2 domény, strukturní odchylka modelu byla určena v rozmezí RMSD hodnot 1.513 Å-2.592 Å. B, Druhé pravděpodobné místo interakce kافru s TRPV1 je uvnitř selektivního filtru tvořeno interakcemi reziduí pórového helixu s postraními zbytky aminokyselin z S6 domény, strukturní odchylka modelu byla určena hodnotami RMSD 0.965 Å-2.529 Å; jako templát byl použit model lidské varianty TRPV1 (Fernandez-Ballester and Ferrer-Montiel, 2008).

Fluorescenční pokusy ukázaly, že kafr na intracelulární straně plazmatické membrány vyvolává změnu v distribuci PIP<sub>2</sub>. Tato změna v rozložení PIP<sub>2</sub> je opačná (zvýšení dostupnosti) ve srovnání s efektem typického agonisty TRPV1 kapsaicinem (štěpení PIP<sub>2</sub>) (obr. 4). Kafr indukuje koncentračně závislý, rychlý, vratný a opakovatelný nárůst FRET signálu nezávisle na přítomnosti receptorů a aktivitě fosfolipázy C (PLC).

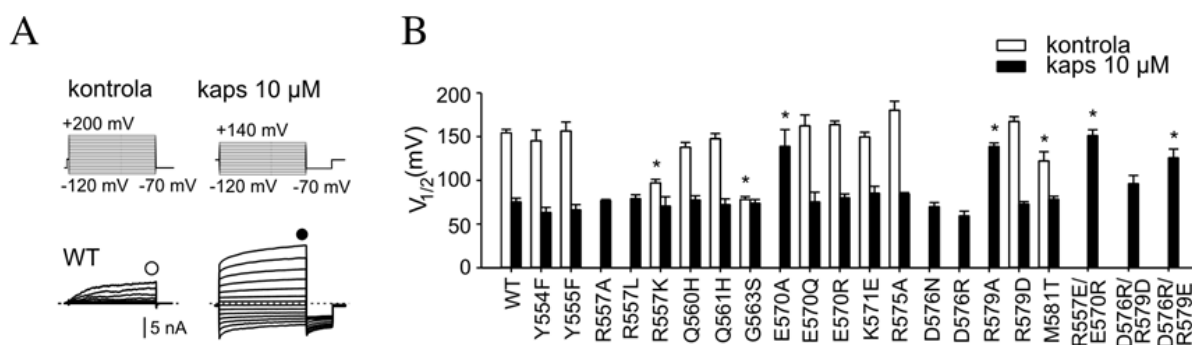


**Obr. 4: Kafr ve srovnání s kapsaicinem vyvolává opačné změny ve FRET signálu z buněk exprimujících TRPV1 receptor.** A, Aplikace kafru vyvolává vratné zvýšení FRET signálu mezi CFP- a YFP- značenými PH doménami, naopak aplikace kapsaicinu vyvolá pokles signálu korespondující s aktivací PLC Ca<sup>2+</sup> resp. s úbytkem PIP<sub>2</sub> v membráně, který je následován resyntézou nových molekul PIP<sub>2</sub> a tím i nárůstem FRET signálu; aplikace 10 μM kapsaicinu vyvolala výrazný pokles interakcí mezi PIP<sub>2</sub> a PH doménami. B, Kafr je schopen částečně navýšit FRET signál, který byl předtím snížen v důsledku deplece molekul PIP<sub>2</sub> po aplikaci kapsaicinu. Uvedené záznamy byly pořizeny z nezávislých HEK293T buněk exprimujících TRPV1 receptor, PH\_CFP a PH\_YFP doménu.

## Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

Systematickým mutováním jednotlivých nabitých aminokyselin jsme identifikovali dva aminokyselinové zbytky R557 v S4 helixu a D576 v S4-S5 klíče, které by mohly být součástí napěťového senzoru TRPV1 receptoru. Záměnou náboje (R557E a D576R) či neutralizací (R557A, R557L a D576N) těchto dvou zbytků jsme získali fenotyp receptorů s narušenou napěťovou citlivostí (obr. 5). Napěťovou závislost TRPV1 receptorů jsme charakterizovali hodnotami membránového potenciálu, při kterých bylo dosaženo poloviční hodnoty maximální vodivosti kanálů vyvolané depolarizujícím napětím ( $V_{1/2}$ ). Pro R557A, R557L, D576R, D576N mutanty nebylo technicky možné odhadnout hodnoty  $V_{1/2}$ , protože rozsah měřicí aparatury neumožňuje regulovat membránový potenciál nad hodnoty vyšší než  $\pm 200$  mV. Překvapivé bylo, že se v přítomnosti saturující koncentrace kapsaicinu hodnoty  $V_{1/2}$  uvedených mutantních variant TRPV1 nelišily od hodnoty WT (obr. 5). Tyto výsledky

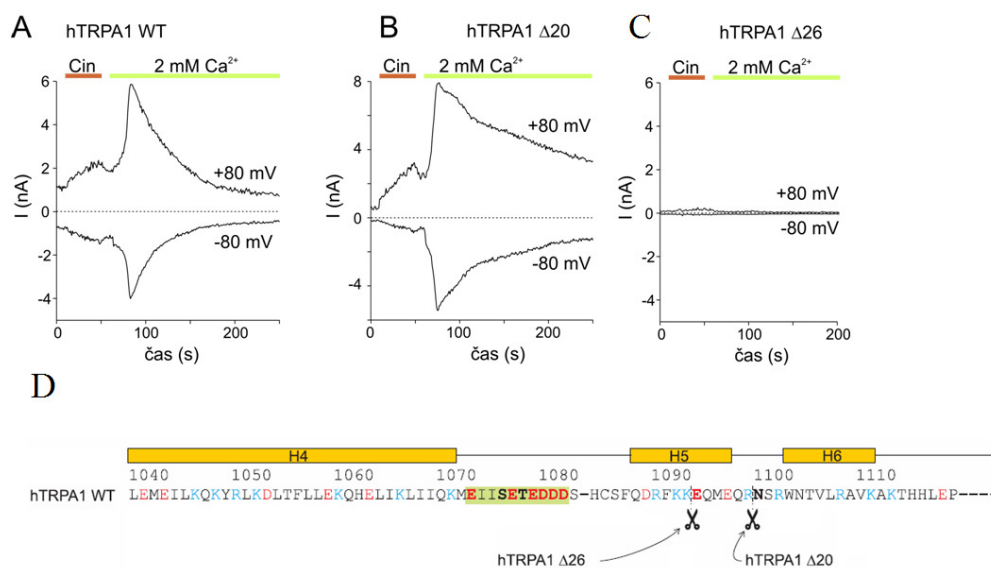
mohou znamenat, že napěťová citlivost v přítomnosti navázaného kapsaicinu je zprostředkována jinými rezidui než ve stavu bez navázaného kapsaicinu. Z hodnot  $V_{1/2}$  mutantů argininu v pozici 557, který je jediným reziduem s pozitivním nábojem v S4 a je považován za hlavní součást napěťového senzoru, je patrné, že lokalizace kladného náboje v této oblasti není v přítomnosti kapsaicinu nutná (hodnoty  $V_{1/2}$  u R557A, R557K jsou shodné s divokým typem receptoru). Na základě těchto výsledků je tedy patrné, že arginin 557 nemůže být jediným reziduem, který tvoří napěťový senzor TRPV1. Dále se nám podařilo prokázat funkční interakce mezi dvojicemi aminokyselin R557-E570 a D576-R579, které se podílí na převodu kapsaicinového signálu k póru TRPV1 kanálu.



**Obr. 5: Napěťová závislost TRPV1 mutantů.** A, Reprezentativní záznamy membránových proudů z celých buněk transfekovaných WT TRPV1 receptoru vyvolaných aplikací 100 ms napěťových skoků v rozmezí membránového potenciálu od -120 do +200 mV (horní záznam) v nepřítomnosti (bílé kolečko, kontrola) či od -120 do +140 mV v přítomnosti 10 μM kapsaicinu (černé kolečko). Mezi pokusy byly buňky udržovány na potenciálu -70 mV. B, Průměrné hodnoty napětí, při kterých vodivosti mutantních forem TRPV1 dosahují poloviny jejich maxima ( $V_{1/2}$ ) v kontrolních podmínkách extracelulárního roztoku (bílé sloupce) a v přítomnosti 10 μM kapsaicinu (černé sloupce). Každý sloupec reprezentuje průměrnou hodnotu  $\pm$  S.E. vypočtenou nejméně ze čtyř nezávislých buněk; hvězdička značí významný rozdíl v hodnotách mezi WT a daným mutantem receptoru.

## Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve $Ca^{2+}$ aktivaci

Zkrácením karboxylového konce TRPA1 receptoru o 20 aminokyselin ( $\Delta 20$ ) jsme získali konstrukt s pomalejší inaktivací závisující na extracelulárním  $Ca^{2+}$  (obr. 6B). Druhý konstrukt zkrácený o dalších šest aminokyselin ( $\Delta 26$ ) již nevedl k funkční expresi kanálů a nebyly pozorovány proudové odpovědi ani na jeden z testovaných podnětů (depolarizační napětí, 100 μM cinamal a roztok obsahující 2 mM  $Ca^{2+}$ ; obr. 6C).

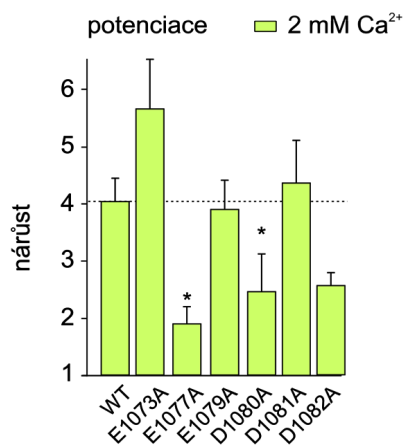


**Obr. 6: Zkrácení C-konce TRPA1 odhalilo místo účastnící se Ca<sup>2+</sup>-závislé inaktivace.** A, Časový záznam proudových odpovědí z celé buňky exprimující WT lidského TRPA1 receptoru měřené na potenciálech +80 a -80 mV, nad proudovými odpověďmi je vyznačena délka aplikace 100 μM cinamalu (Cin, hnědá čára) v nepřítomnosti extracelulárního Ca<sup>2+</sup> s následnou aplikací extracelulárního roztoku obsahující 2 mM Ca<sup>2+</sup> (zelená čára). Shodný protokol jako v případě A, byl použit i pro mutantní varianty TRPA1 receptoru se zkrácenými C-konci. B, Po zkrácení C-konce receptoru o 20 aminokyselin (hTRPA1Δ20) došlo ke zpomalení Ca<sup>2+</sup>-závislé inaktivace kanálu, a to bez změny v aktivaci cinamalem či v míře Ca<sup>2+</sup> potenciace. C, Konstrukt receptoru se zkráceným C-koncem o 26 reziduí (Δ26) neodpovídal na testované stimuly. D, Sekvence distální části C-konce lidské varianty WT TRPA1 s predikcí sekundární struktury, v sekvenci jsou obsaženy tři helixy (H4, H5 a H6, žluté obdélníky), oblast bohatá na kyselá rezidua je zvýrazněna zeleně, nůžky znázorňují místa zkrácení C-konce konstruktů.

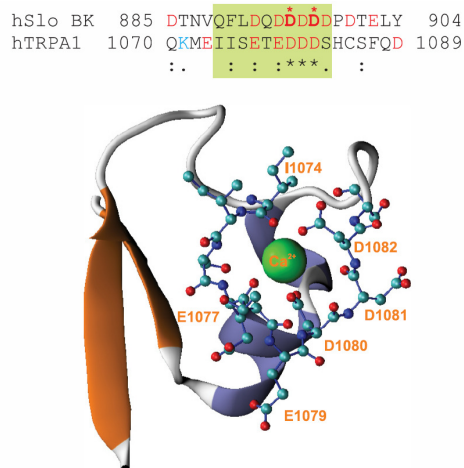
Funkčním testováním TRPA1 mutantů se záměnami reziduí v oblasti distálního C-konce (E<sup>1073</sup>I ISETEDDD<sup>1082</sup>) se ukázalo, že přítomnost záporně nabitých reziduí E1077 a D1080 (obr. 7A) je nezbytná pro správnou míru vápníkové potenciace odpovědí vyvolaných cinamalem.

Dva aminokyselinové zbytky aspartátu D1080 a D1082 byly na základě homologního modelu (obr. 7B) a počítačové simulace vazby vápníku do oblasti kyselých aminokyselin karboxylového konce navrženy jako místa interakce TRPA1 receptoru s ionty vápníku.

A



B



**Obr. 7: Neutralizace kyselých reziduí poškozuje Ca<sup>2+</sup>-potenciaci odpovědi vyvolaných cinamalem.** A, potenciace cinamalem vyvolaných odpovědí vynesena jako nárůst amplitud proudových odpovědí  $\pm$  S.E. indukovaná 2 mM Ca<sup>2+</sup> roztokem, hvězdička značí významné rozdíly mezi hodnotami získanými pro WT a mutantním receptorem. B, Horní obrázek: Sekvenční porovnání Ca<sup>2+</sup>-vázející domény draselného BK receptoru (hSlo) s C-koncovou doménou lidského TRPA1 receptoru, nejvíce konzervované aminokyseliny jsou označeny hvězdičkou. Dolní obrázek: Homologní model Ca<sup>2+</sup>-vázejícího místa TRPA1 receptoru na základě struktury BK receptoru jako templátu (BK/TRPA1 chiméra).

## 6. DISKUZE

### Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

Naše výsledky podpořily hypotézu o působení kafru prostřednictvím pórového helixu z extracelulární strany. Tuto představu podporuje i predikce vazebného místa pro kafr metodou počítačového modelování. Jedno ze dvou nejpravděpodobnějších míst vazby kafru na TRPV1 byla právě oblast selektivního filtru (L638 a F639) s leucinem v poloze 648 na sousední kličce mezi pórovým helixem a S6 doménou (obr. 3B). Uvedené výsledky z dokovacího experimentu byly získány s využitím lidské varianty receptoru jako templátu (Fernandez-Ballester et al., 2008), neboť je to v současnosti nejpřesnější model struktury vaniloidního receptoru. Shodných výsledků bylo však dosaženo i při použití krysí varianty receptoru (Brauchi et al., 2007). Dokovací experimenty tak poskytly podpůrné informace o tom, že by se kafr mohl přímo vázat do oblasti selektivního filtru kanálu. Tuto představu podporuje i částečně blokující efekt kafru, který byl pozorovatelný na elektrofyziologickém záznamu jako částečný návrat proudu po odmytí kafru (obr. 1b znázorněné šipkou). Druhé ze dvou nejpravděpodobnějších predikovaných míst vazby molekuly kafru na receptor je lokalizováno na intracelulární straně rozhraní receptoru s lipidy, a to prostřednictvím interakcí aminokyselin na S1 (W427 a



K432) a S2 helixu (Y487, F490, R491 a F496) (obr. 3A). Tuto variantu vazebného místa jsme dále experimentálně neověřovali a je otevřena pro další studie.

Ve srovnání s jinými agonisty TRPV1 receptoru má kafr nižší lipofilicitu ( $\log P = 2.2$  vs. kapsaicin  $\log P = 3.8$ ) a lze tedy předpokládat i pomalejší rychlost difúze do membrány (Ursu et al., 2010). Na úrovni receptoru se však účinek kafru projevuje rychlým nástupem aktivace, deaktivace a potenciace receptoru. Z tohoto důvodu nelze předpokládat, že modulace TRPV1 kanálu je odrazem bezprostředních změn fyzikálních vlastností plazmatické membrány, ale především výsledkem specifických interakcí této látky s receptorem. Pozorované změny na úrovni membrány (přiblížení  $\text{PIP}_2$  molekul) mohou však zásadním způsobem souviset se strukturní změnou receptoru po aktivaci iontového kanálu.

Předmětem studia řady laboratoří je otázka odlišné kafrové citlivosti u TRP ortologů. Většina dat uvedených v naší publikaci byla získána experimenty na krysí variantě TRPV1, u které byl kafr popsán jako částečný agonista (Xu et al., 2005) (naše data  $\sim 30\%$  maximální odpovědi na  $10\ \mu\text{M}$  kapsaicin). S překvapením jsme zjistili, že kafr téměř neaktivuje lidský ortolog TRPV1 receptoru ( $\sim 1,3\%$  z maximální odpovědi na  $10\ \mu\text{M}$  kapsaicin). Stejně jako u krysí varianty je však schopen potencovat a deaktivovat kapsaicinem vyvolané odpovědi. Jedním z dalších popsáných účinků (a kontroverzí) je schopnost kafru inhibovat lidskou variantu a aktivovat hmyzí varianty TRPA1 receptoru (Kohno et al., 2010). Kromě citlivosti na kafr se tyto různé varianty TRPA1 receptoru liší také v teplotní citlivosti. Na rozdíl od chladem aktivované savčí varianty je hmyzí forma receptoru aktivovaná teplem ( $> 34\ ^\circ\text{C}$ ). Nepochybně jsou tedy determinanty TRP receptorů určující kafrovou citlivost, ale i citlivost teplotní, evolučně konzervované.

Výsledky předložené dizertační práce prokazují důležitou úlohu vnější pórové domény v řízení vrátkování TRPV1 iontového kanálu kafrem. Získaná data navíc podporují současnou představu o tom, že pórová helikální doména představuje univerzální vrátkovací element TRPV i pro další aktivační modality, jako jsou napětí a protony. Výsledky našich experimentů naznačují, že kafr může navíc přímo interagovat s vrátkovacím mechanismem TRPV1 kanálu.

V souhrnu, výsledky této části dizertační práce mohou přispět k bližšímu objasnění molekulárních mechanismů, kterými kafr moduluje teplotní citlivosti u lidí a může pomoci odhalit kritické determinanty pro nesporné pozitivní účinky této přírodní látky.

## Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

Při hledání napěťového senzoru TRPV1 receptoru jsme se zabývali otázkou, do jaké míry by mohl být mechanismus transdukce napěťového

podnětu analogický se strukturně příbuznými  $K^+$  kanály, u kterých se předpokládá, že napěťový senzor je vytvářen kladně nabitými rezidui uvnitř S1-S4 modulu. Pro  $K^+$  a  $Na^+$  iontové kanály bylo prokázáno, že konformační změny v oblasti napěťového senzoru vyvolané změnou membránového potenciálu se uplatňují prostřednictvím S4-S5 oblasti, jež bezprostředně předává signál do pórové oblasti S6 domény, která řídí vrátkování iontového kanálu (Bezanilla, 2008, Villalba-Galea et al., 2008).

V naší studii jsme se zaměřili na intracelulární oblast S4-S5 helixů, která je mezi vaniloidními zástupci TRP receptorů bohatá na konzervované pozitivně nabitě aminokyseliny. Kladně nabitá rezidua v této oblasti byla v nedávné studii identifikována jako součást napěťového senzoru u TRPM8 receptoru (Voets et al., 2007). S4-S5 oblast je však také hlavní součástí vrátkovacího mechanismu řady homologních napětím aktivovaných kanálů a zřejmě také TRPM8 kanálu (Catterall, 2010, Voets et al., 2007), což znemožňuje experimentálně oddělit od sebe místa důležitá jako napěťový senzor od obecně důležitých domén, jako je součást vrátkovacího systému a vazebné místo pro agonistu (Boukalova et al., 2010, Voets et al., 2007). Napětí je významným modulátorem teplotně citlivých TRP kanálů, který sám o sobě však není schopen maximální aktivace těchto kanálů (Matta and Ahern, 2007). Na rozdíl od relativně dobře prozkoumaného mechanismu napěťové aktivace u napětím řízených  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$  kanálů, u TRP kanálů je o tomto mechanismu aktivace známo jen velmi málo. Jako klasický napěťový senzor  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$  kanálů je považována oblast S1-S4 helixů každé ze čtyř homologních podjednotek resp. zde přítomné nabitě aminokyselinové zbytky, které reagují na změnu membránového napětí svým přeorientováním. Změna ve strukturním uspořádání aminokyselinových zbytků je převedena S4-S5 kličkou až k vrátkům kanálu. V rámci S1-S4 modulu jsou strukturně oddělena kyselá (S1-S3 helix) a bazická rezidua (S4 helix), přičemž v rámci S4 helixu jsou bazická rezidua (R a K) mezi sebou oddělena dvěma hydrofobními rezidui (Bezanilla, 2008). Tento tzv. S4 typ napěťového senzoru u TRPV receptorů není přítomen, neboť v S4 helixu je přítomen pouze jeden kladně nabitý aminokyselinový zbytek R557.

## Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve $Ca^{2+}$ aktivaci

Jako jediné dosud identifikované místo interakce vápenatých iontů s TRPA1 receptorem, které je zodpovědné za jeho aktivaci, bylo nalezeno na jeho N-konci, a to v rámci  $Ca^{2+}$ -vázejícího EF-hand motivu (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007). Na základě nejnovější elektronové kryomikroskopické struktury TRPA1 kanálu je pravděpodobným místem dostupným pro  $Ca^{2+}$  ionty procházející pórem také karboxylový konec receptoru, který v homotetramerickém uspořádání vytváří strukturu paralelní k plazmatické membráně a pomáhá utvářet vnitřní vestibul kanálu (Cvetkov et al., 2011). Na možný význam proximálního karboxylového konce ve vrátkování TRPA1

upozornily již dříve publikované práce naší laboratoře (Benedikt et al., 2009, Samad et al., 2011). V rámci disertační práce se nám podařilo potvrdit význam distální části C-konce, respektive roli posledních 20 aminokyselin tvořících H6 helix jako nezbytné součásti  $\text{Ca}^{2+}$ -závislého inaktivačního mechanismu ankyrinového receptoru.

Věrohodnost získaného modelu, ukazující možné místo interakce vápenatých iontů do oblasti C-konce receptoru, podporuje skutečnost, že jsme u elektrofyziologických odpovědí jednotlivých mutantů E1073, E1077, D1080, D1081 a D1082 nepozorovali změnu odpovědi na cinamal, ale rezidua se ukázala být mnohem důležitější při modulaci  $\text{Ca}^{2+}$ .

Předkládaná disertační práce tak přispěla k identifikaci specifické oblasti nezbytné pro správnou modulaci TRPA1 kanálu řízenou  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a rovněž jako pravděpodobné místo vazby  $\text{Ca}^{2+}$  iontů.

## 7. ZÁVĚR

### Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

Potvrdili jsme výchozí hypotézu, že kafr je částečným agonistou TRPV1 receptoru, jehož mechanismus působení je nezávislý na vazebném místě pro vaniloidy. Kafrová modulace TRPV1 je zprostředkována rychlou konformační změnou extracelulárního pórového helixu, která ovlivňuje rovnováhu aktivace iontového kanálu mezi otevřeným a zavřeným stavem. Pórový helix představuje pravděpodobně i místo interakce kafru s receptorem. Dalším možným místem interakce byla navržena intracelulární oblast mezi S1 a S2 doménami. Na modulaci kafrových odpovědí TRPV1 se může také podílet zvýšená dostupnost  $\text{PIP}_2$ , která byla v přítomnosti kafru experimentálně pozorována.

Závěrem lze říci, že se nám podařilo navrhnout molekulární mechanismus aktivace TRPV1 kanálu látkou s analgetickým účinkem, kterou představuje kafr. Získané poznatky o strukturní modulaci TRPV1 kanálu mohou přispět k poznání mechanismu, jakým kafr moduluje teplotní citlivost *in vivo*.

### Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

Funkčním testováním nabitých aminokyselin v oblasti S4-S5 byly identifikovány čtyři nabitě aminokyseliny (R557, E570, D576 a R579), které se účastní napěťové a chemické aktivace TRPV1 kanálu. Navzdory vysoké konzervovanosti S4-S5 oblasti mezi TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptory není význam jejich homologních aminokyselin pro funkci těchto kanálů shodný.

## Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca<sup>2+</sup> aktivaci

Podařilo se nám potvrdit výchozí hypotézu, že úsek kyselých aminokyselin v distální části karboxylového konce TRPA1 receptoru se účastní jeho vápníkové modulace a představuje možné místo interakce receptoru s vápenatými ionty. Zjistili jsme, že oblast posledních 20 aminokyselin karboxylového konce TRPA1 je nezbytná pro komplexní průběh inaktivace cinamalem vyvolaných proudových odpovědí závislé na vápenatých iontech.

# 1. SUMMARY

Detection of painful stimuli in the periphery is mediated by temperature-sensitive transient receptor potential (TRP) channels which are expressed in primary afferent endings of free sensory neurons called nociceptors. TRP channels in nociceptors are involved in the detection of thermal, but also mechanical and chemical stimuli. Out of seven known types of temperature-sensitive TRP channels, three are responsible for detecting painful temperatures: vanilloid receptors TRPV1 ( $> 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and TRPV2 ( $> 52\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) detect noxious heat, and ankyrin receptor TRPA1 detects noxious cold ( $< 17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Better knowledge of TRP channel mechanisms of action is essential for understanding TRP channel functions and ultimately for the design of potential analgesics. New findings presented in this thesis clarify mechanisms of action of TRPV1 and TRPA1 receptors, focusing on camphor and voltage sensitivity of TRPV1 channels and calcium modulation of TRPA1 channels.

The first topic discussed in this thesis is the mechanism of camphor sensitivity of TRPV1 receptor. Camphor is a naturally occurring substance known since time immemorial for its effective analgesic properties, yet its mechanism of action is not understood. Camphor is known to be a partial agonist of TRPV1 channel, a full agonist of TRPV3 channel, but also an inhibitor of TRPA1 channel. In this study we investigated the effects of camphor on TRPV1 activity, as well as camphor-induced changes in the properties of plasma membrane. We found that camphor is able to quickly activate TRPV1 channels through conformational changes in a short helix located inside the channel pore. This helix is proposed as the site of camphor interaction with the receptor. Moreover, camphor induced changes in the distribution of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, a minor phospholipid component of the plasma membrane and an important TRPV1 modulator. This mechanism of action can be also important for camphor-induced modulation of other PIP<sub>2</sub>-sensitive membrane receptors.

In addition to camphor sensitivity of TRPV1, we have studied the function of the S4-S5 region of TRPV1. The results were compared with the function of corresponding amino acids in two other vanilloid channels, TRPV2 and TRPV3. Although the residues within the S4-S5 region are strongly conserved among TRPV channels, some of the conserved charged residues serve distinct functions in thermal, voltage, and chemical sensitivity of the different members of the TRPV family.

The final topic discussed in this thesis is the role of the distal part of the C-terminal end of the TRPA1 channel in calcium-dependent modulation. TRPA1 is an ion channel whose function is strongly modulated by Ca<sup>2+</sup> ions, but the mechanism of this modulation has not been identified. Our experimental data suggest that the C terminus of the TRPA1 receptor serves as a calcium sensor.

Amino acid substitutions in this area have demonstrated the role of these residues in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced potentiation and inactivation. These results contribute to a better understanding of TRPA1 channel function in chemical nociception.

## 2. INTRODUCTION

TRP channels are expressed in almost all types of animal tissues. In primary sensory neurons represent transduction molecules that in nerve endings detect a wide range of external stimuli, recognize between harmful and harmless stimuli and transduce this information to the central nervous system. Polymodal TRPV1 and TRPA1 channels are key molecules that provide detection of stimuli evoke pain in humans and are likely to be involved in the mechanisms of chemical, thermal and mechanical nociception under physiological and pathophysiological conditions.

Camphor is an organic waxy substance used topically for its counterirritant and analgesic properties (Green, 1990). This compound modulates the activity of various thermosensitive ion channels from the TRP channel family expressed in skin and neural tissues (Macpherson et al., 2006, Vogt-Eisele et al., 2007). Camphor activates and strongly desensitizes the capsaicin- and noxious heat-evoked TRPV1 responses. This finding has provided new insights and opened up new research ways toward understanding why this naturally occurring monoterpene is widely used in human medicine for its local counter-irritant, antipruritic, and anesthetic properties. However, the molecular basis for camphor sensitivity remains mostly unknown. This thesis attempts to explore the nature of the camphor modulation mechanism of TRPV1 channel and a putative binding site at TRPV1.

TRPV1 channel is a transducer of noxious thermal stimuli (more than  $43^{\circ}\text{C}$ ) (Caterina et al., 1997). TRPV1 can be modulated by protons ( $\text{pH} < 6.8$ ), which directly activate and potentiate the channel from the extracellular side (Jordt et al., 2000, Ryu et al., 2007); temperatures greater than  $43^{\circ}\text{C}$  (Caterina et al., 1997); and strongly depolarizing voltages ( $V_{1/2} \sim 150 \text{ mV}$ ) (Matta et al., 2007, Voets et al., 2004). In vanilloid members of TRP channels, the conserved charged residues in the intracellular S4–S5 region have been proposed to constitute part of a voltage sensor that acts in synergy with other stimuli to regulate channel activation. The molecular basis of this gating event is poorly understood. Based on the structural similarity to voltage-gated potassium channels, the voltage-sensing domain in these channels is hypothesized to be composed of positively charged amino acids distributed within the S1–S4 domain that reorient upon a change in the membrane potential (Bezanilla, 2008, Villalba-Galea et al., 2008). This domain is predicted to be coupled through the S4–S5 linker helices to the inner helices of the S6 segments which dilate (open) and constrict (close) the pore entryway (Long et al., 2005).

One of the ubiquitous and probably the most important physiological activators of TRPA1 are calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ), which enter through the channel or are released from internal stores and, depending on the activation state of the channel, dynamically control its critical properties such as unitary conductance, ion selectivity, channel opening probability (Nagata et al., 2005, Nilius et al., 2011), and surface expression levels (Schmidt et al., 2009). At micromolar concentrations,  $\text{Ca}^{2+}$  ions activate the channel from the intracellular side (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007) and strongly potentiate its chemically and voltage-induced responses. This potentiation is followed by an almost complete and irreversible inactivation, and both processes are accelerated at higher intracellular concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang et al., 2008). Although physiologically extremely important, the molecular mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation and inactivation are still a matter of controversy.

### 3. AIMS OF THE STUDY

#### Mechanism of camphor sensitivity of TRPV1 channel

Camphor is a partial agonist of TRPV1, whose mechanism of action is independent of the vanilloid binding site. Based on the finding that the kinetics of camphor response is quick, we assumed that camphor directly interacts with the receptor from the extracellular side. Camphor is among other lipophilic substance used in high concentrations and can not therefore neglect the possibility of an indirect effect of camphor via a TRPV1 significant receptor modulator  $\text{PIP}_2$ .

#### **Aims:**

- A) By electrophysiological experiments describe the kinetic characteristics of camphor responses of TRPV1 channel and compare them with the responses of classical agonist capsaicin.
- B) Characterize camphor modulation of membrane currents mediated by typical TRPV1 activators such as capsaicin, heat, protons and depolarization voltage.
- C) Suggest a possible mechanism by which camphor modulates TRPV1 channel and suggest a binding site for camphor at TRPV1.
- D) Based on FRET experiments describe the dynamics of  $\text{PIP}_2$  molecules in the membrane in the presence of camphor and compare it with the redistribution of this phospholipid in the presence of capsaicin. Suggest the possible role of  $\text{PIP}_2$  in camphor modulation of TRPV1 channel.

## Functional and structural role S4-S5 region in temperature activated TRPV channels

Intracellular part of the S4-S5 domain of the temperature sensitive vanilloid members (TRPV1, TRPV2 and TRPV3) of TRP channels represents a highly conserved region with charged residues that might be important for the function of these receptors, as well as the relative TRPM8 channel form part of the voltage sensor.

### **Aims:**

- A) Prepare mutant channels by neutralizing all charged amino acids in the S4-S5 region of TRPV1. Electrophysiologically characterize them by measuring the sensitivity to depolarizing voltage and chemical sensitivity to capsaicin.

## The role of the C terminus of TRPA1 channel in Ca<sup>2+</sup> activation

The distal part of the carboxy end of the TRPA1 channel contains a region rich in negatively charged amino acids, which could represent a potential site for its calcium modulation.

### **Aims:**

- A) By functional study of TRPA1 constructs with a truncated C-terminus to determine the importance of this part of the channel in its function.
- B) Preparation and functional testing of individual mutations in the distal C-terminus of TRPA1, rich in negatively charged residues (E<sup>1073</sup>I ISETEDDD<sup>1082</sup>). Determining the phenotype of the mutant TRPA1 channel tested for sensitivity to depolarizing voltage, cinamal and potentiation and inhibition of calcium-induced cinamal responses.
- C) Using homology modeling and molecular dynamics simulations to examine possible interaction of TRPA1 with calcium ions.

## **4. MATERIALS AND METHODS**

### ***Expression and constructs***

HEK293T were cultured in OPTI-MEM I medium (Life Technologies, USA) supplemented with 5% fetal calf serum. Cells were cotransfected transiently with 200-600 ng complementary DNA plasmid encoding wild type or mutant rat TRPV1 (kindly provided by David Julius, USA), human TRPV1 (Origene Technologies, USA), human TRPV2 (Origene Technologies, USA), human TRPV3 (kindly provided by Ardem Patapoutian, USA) and human TRPA1 channel (Origene Technologies, USA) with 150 ng green fluorescent protein plasmid (TaKaRa, Japan) per 1.6 mm dish using the magnet-assisted transfection (IBA, Germany) method. The mutants were generated by PCR using the QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis kit (Agilent



Technologies, USA) and confirmed by DNA sequencing (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems). The chimeric ( $\Delta 15$ -TRPV1:Y627-C634) and the deletion ( $\Delta 15$ -TRPV1) constructs of TRPV1 were provided by Feng Qin (Buffalo, USA). For fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements, HEK293T were transfected with cyan (CFP)- and yellow fluorescent protein (YFP)- tagged pleckstrin homology (PH) domains of PLC $\delta$ 1 (provided by Tamas Balla, Bethesda, USA). Cells were used 24-48 h after transfection. At least four independent transfections were used for each experimental group. The wild type channel was regularly tested in the same batch as the mutants.

### ***Electrophysiology***

Standard whole cell electrophysiology techniques were used. Whole cell membrane currents were recorded by employing an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, USA) and pCLAMP10 software (Molecular Devices). Series resistance was compensated by at least 70% in all recordings. Experiments were performed at room temperature (23°-25°C). Only one recording was performed on any one coverslip of cells to ensure that recordings were made from cells not previously exposed to chemical stimuli. A system for rapid superfusion of the cultured cells was used for drug application (Dittert et al., 2006). The extracellular control solution contained: 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM glucose; adjusted to pH 7.3 and 320 mOsm. In whole cell, patch clamp experiments, the pipette/intracellular solution contained: 125 mM glucono- $\delta$ -lactone, 15 mM CsCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM Mg-adenosine triphosphate; pH 7.3, 286 mOsm. All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic).

### ***FRET Measurements***

For FRET measurements, we used the Cell<sup>^</sup>R imaging system based on an Olympus IX-81 inverted microscope (Olympus, Japan) equipped with a dual-emission setup (Dual-View Optical Insights, LLC; Santa Fe, NM). The excitation wavelength was 436 nm, and emission was detected in parallel at 470 and 535 nm. The excitation light was generated with a Polychrome V polychromator (Till Photonics, Germany), and the fluorescence emission was detected with a Hamamatsu Orca-ER camera (Hamamatsu Photonics, Japan). Data were collected using Cell<sup>^</sup>R software (Olympus), and the fluorescence analysis was done using the program ImageJ (Bethesda, USA).

### ***Statistical Analysis***

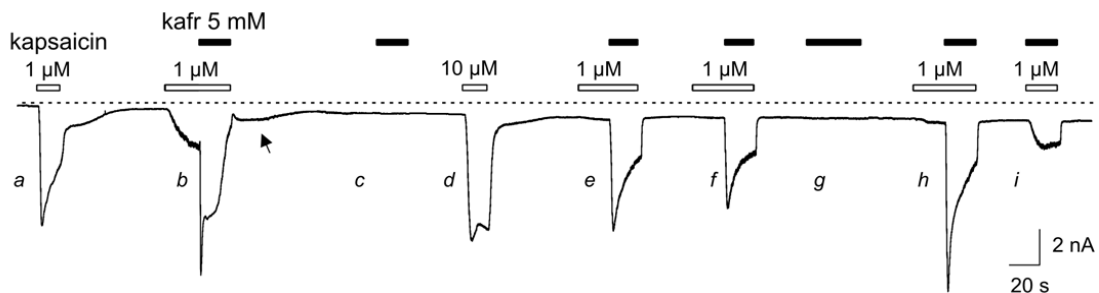
The data were analyzed using pCLAMP 10 (Molecular Devices GmbH, Germany), and curve fitting and statistical analyses were done in SigmaPlot 10 and SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL). Significance levels were determined by a two-tailed Student independent *t* test. Data comparisons of three or more groups were performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's

*post hoc* comparison. Correlations were determined with the Spearman rank order correlation test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ , unless stated otherwise. All results are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or as mean  $\pm$  standard error (SE).

## 5. RESULTS

### Mechanism of camphor sensitivity of TRPV1 channel

Camphor activates TRPV1 in a dose-dependent manner with  $EC_{50} \sim 5$  mM at the membrane potential +70 mV. Fast kinetics of activation, deactivation of camphor-mediated TRPV1 responses and complete repetition of camphor potentiation of capsaicin-evoked responses (fig. 1) support the hypothesis that camphor activates TRPV1 channel through direct interaction. Repeated camphor-induced potentiation of capsaicin responses is state-dependent, being more effective on the capsaicin-occupied form of the channel. The efficacy of camphor dramatically increases if other modalities, such as heat or voltage, act on the TRPV1 synergistically. Camphor only slightly affects responses induced by low pH (pH = 6.8).

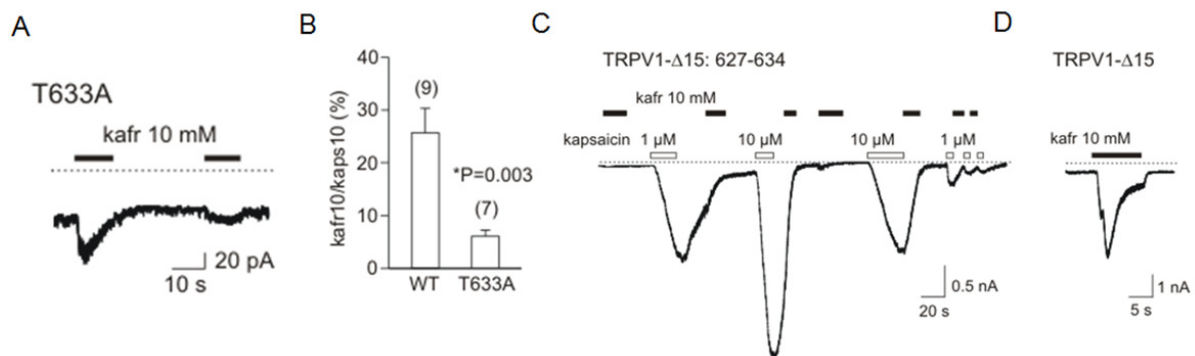


**Fig. 1: Camphor-induced potentiation of capsaicin responses in TRPV1 channel.** Sample recording of whole cell current responses to consecutive applications of capsaicin (1  $\mu$ M), camphor (5 mM), their combination, and capsaicin 10  $\mu$ M in TRPV1-expressing HEK293T cell. Horizontal bars indicate the duration of capsaicin (whitebars) and camphor (black bars) application. Dashed lines indicate zero current level. Holding potential -70 mV. Camphor in combination with capsaicin, repeatedly potentiates TRPV1 channels to their maximal activation capacity (b, e, f, h). This camphor-induced potentiation is state-dependent, being more effective on the capsaicin-occupied form than the closed (compare h with. i) form of the channels.

Within the pore helix, a single residue, T633, is crucial for direct activation by acidic pH (Ryu et al., 2007). We found that camphor evoked currents through the T633A mutant were statistically significantly smaller than those induced in wild-type channels (fig. 2A,B). The results from these experiments identified T633 as a residue involved in camphor activation and

suggest that the activation pathways are partly shared between camphor and protons. In an attempt to narrow the critical region for camphor modulation, we tested camphor sensitivity in a TRPV1 chimera (TRPV1- $\Delta$ 15: 627-634) that lacked the stretch of 15 nonconserved residues between the turret and selectivity filter (T612-S626) and in which the pore helix (Y627-C634) was replaced with the counterpart from TRPV2, a camphor-insensitive homolog. As described previously (Ryu et al., 2007), this construct exhibited a markedly slower onset and offset of capsaicin responses (fig. 2C) and was completely insensitive to low pH. We found that, in contrast to T633A, the pore helix chimera was completely insensitive to depolarizing voltages. Most importantly, in this chimera, 10 mM camphor neither induced measurable currents nor potentiated capsaicin-induced currents (fig. 2C). The control deletion mutant with a minimal pore lacking the 15-residue stretch had the same sensitivity to camphor as the wild type (fig. 2D). These results strongly indicate that the pore helix mediates the camphor sensitivity of TRPV1.

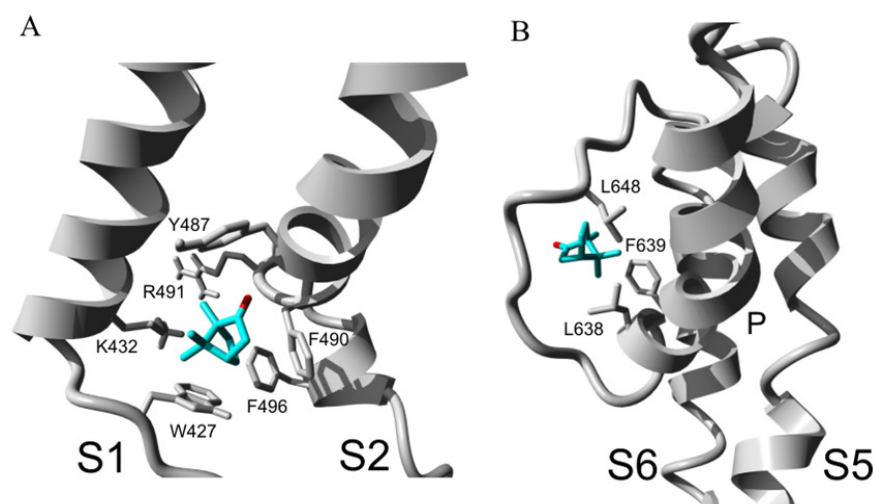
These data also support the hypothesis that the pore helix domain represents a universal gating element common to various distinct modalities (Myers et al., 2008).



**Fig. 2: The pore-helix domain plays a critical role in camphor sensitivity of TRPV1.** A, Alanine substitution of pore-helix threonine 633 (T633A) caused significant reduction in camphor-evoked responsiveness. B, Quantification of maximal peak current density at -70 mV for camphor evoked currents in wild type (WT) and in T633A mutant. Data represent mean  $\pm$  SD. Number of cells is in parentheses. C, The TRPV1 chimera (TRPV1- $\Delta$ 15: Y627-C634) lacked the stretch of 15 nonconserved residues between the turret and selectivity filter (T612-S626), and the pore helix (Y627-C634) was replaced with the counterpart from TRPV2, a camphor-insensitive homolog. TRPV1 chimera (TRPV1- $\Delta$ 15: Y627-C634) is completely insensitive to camphor. Camphor neither induced any detectable currents nor potentiated its capsaicin-evoked responses. This construct was reported previously to uncouple proton activation from other TRPV1 activation stimuli and exhibit a slow onset and offset of capsaicin responses. D, Control deletion mutant of TRPV1 that lacked 15 nonconserved residues between T612-S626 responded to camphor normally.

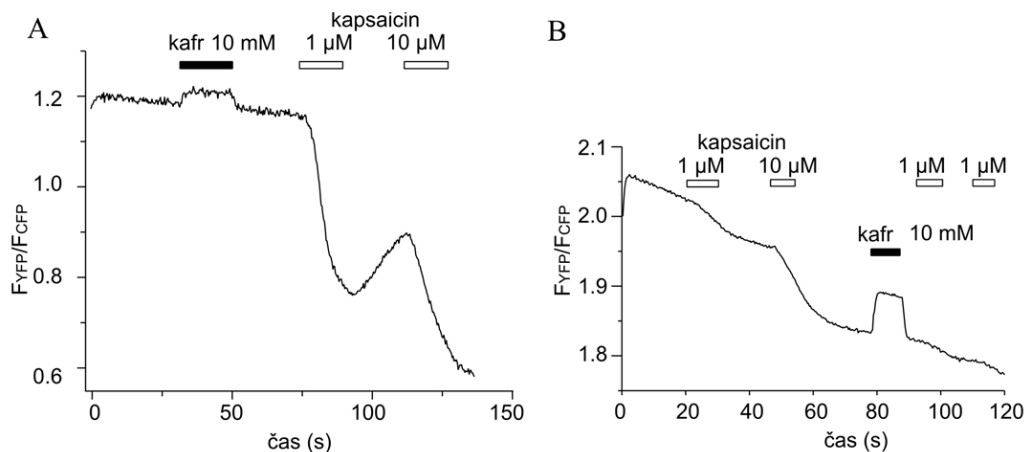
The docking experiment proposed two possible docking sites for camphor at TRPV1 receptor: the pore domain between S5-S6 (fig. 3B, L638, L648 and F639) and the area at the interface helices S1-S2 (fig. 3A, W427, K432, Y487,

R491, F490 and F496). The first docking pose - the outer pore of ion channel - is in agreement with our functional testing (the experiments with chimera).



**Fig. 3: Prediction of binding site for camphor and TRPV1 channel.** A, Representative conformation of first predicted docking site facing lipid-exposed intracellular part of transmembrane domains 1 and 2 of human TRPV1, taken from most populated cluster of lowest energy docking sites. Main interactions stabilizing the putative complex between camphor and TRPV1 are W427, K432 in S1 and F496, F490, R491, Y487 in S2. The structural deviation for this binding mode was 1.513 Å for the lower bound root-mean-square deviation (RMSD) value and 2.592 Å for the upper bound RMSD. The affinity was -5.6 kcal/mol. B, Second docking site within the selective filter of TRPV1. The main interactions stabilizing the putative complex between camphor and TRPV1 are: L638 and F639 in the pore-helix domain (P) and L648 in the external linker between the pore-helix and S6. The structural deviation for this binding mode was 0.965 Å for the lower bound RMSD value and 2.529 Å for the upper bound RMSD. The affinity was -4.6 kcal/mol. The docking experiments are based on the model of human TRPV1 (Fernandez-Ballester et al., 2008). Similar docking predictions were obtained with the docking template based on the homology model of rat TRPV1 (Brauchi et al., 2007).

Fluorescence experiments showed that camphor on the intracellular side of the plasma membrane causes a change in the distribution of PIP<sub>2</sub> (fig. 4). We observed significant increase in the FRET signal upon 15–20 s of exposure to 10 mM camphor and a slower and delayed decrease in FRET in response to capsaicin. This latter, slower process exhibited a time course corresponding to the TRPV1-mediated, Ca<sup>2+</sup>-dependent hydrolysis of PIP<sub>2</sub> and was followed by a slow and incomplete recovery upon washing, most likely corresponding to the replenishment of PIP<sub>2</sub> levels through the action of phosphatidylinositol phosphate kinases (Lukacs et al., 2007, Qin, 2007). In contrast, the camphor-induced increases in FRET, which were found to be independent of TRPV1, were rapidly reversible upon washout.

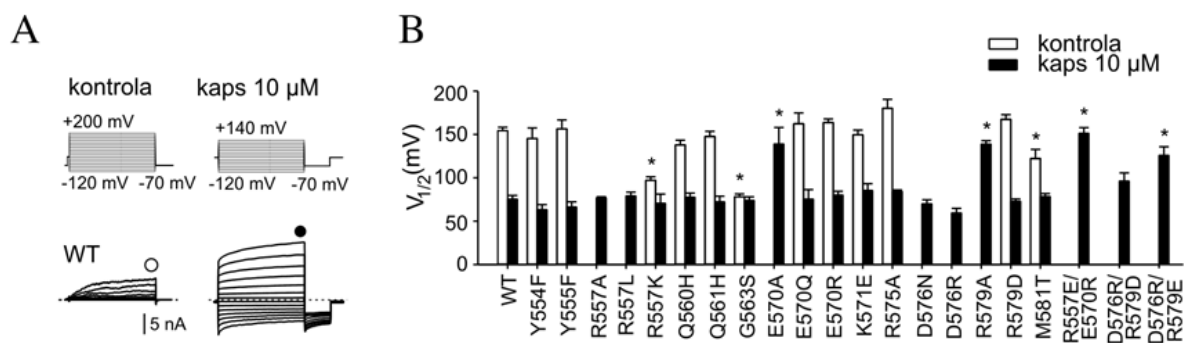


**Fig. 4: Comparison of FRET responses to camphor and capsaicin in HEK293T cells expressing TRPV1 channel and CFP- and YFP-tagged PH domains of PLC $\delta$ 1.** The time course of corrected FRET ratio, assessed as the ratio of fluorescence intensities ( $F_{YFP}/F_{CFP}$ ). Horizontal bars indicate the duration of the indicated drug applications. A, Camphor-induced increases in FRET ratio, assessed as ratio of  $F_{YFP}$  over  $F_{CFP}$ . We observed a statistically significant increase in the FRET signal upon 15–20 s of exposure to 10 mM camphor and a slower and delayed decrease in FRET in response to 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M capsaicin. B, The trace shows the recording of changes in FRET ratio. Note the extent to which camphor temporarily recovers the FRET ratio that had been decreased previously by PIP<sub>2</sub> depletion as a consequence of TRPV1 activation by 1  $\mu$ M capsaicin.

## Functional and structural role S4-S5 region temperature activated TRPV channels

We individually substituted all charged amino acid residues in the transmembrane segment S4 and the S4–S5 linker of rat TRPV1 and characterized the phenotypes of mutants using whole cell patch clamp recordings from transiently transfected HEK293T cells. Previously published homology models for TRPV1 (Brauchi et al., 2007, Fernandez-Ballester et al., 2008), based on the crystal structure of Kv1.2, predict an interaction of R557 with E570, and, another electrostatic interaction within the S4–S5 segment can be inferred for the pair of the two oppositely charged residues spaced about one helix turn apart, D576 and R579. We thus also tested the functional properties of three charge-swapping double mutants, R557E/E570R, D576R/R579D, and D576R/R579E. We hypothesized that if specific interactions between opposite charges are required for proper functioning, the charge-reversing double mutants might functionally rescue the channel. Voltage-dependent activation properties were initially assessed from the steady-state conductances at different test potentials using 20 mV voltage steps from -120 mV up to +200 mV, first in the extracellular control solution and then in the maintained presence of a saturating (10  $\mu$ M) concentration of capsaicin. Voltage dependence of TRPV1 channel was characterized by values of a half-maximal activation voltage ( $V_{1/2}$ ).

We identified two amino acids: R557 in S4 helix and D576 in S4-S5 loop, which could be a part of the voltage sensor of TRPV1. By replacing charge (R557E and D576R) or neutralization (R557A, R557L and D576N) of these residues we got channel phenotypes with impaired voltage sensitivity (fig. 5B). For R557A, R557L, D576R, D576N mutants was not technically possible to estimate the values of  $V_{1/2}$ , because the range of the measuring apparatus does not regulate membrane potential of  $V_{1/2}$  values greater than  $\pm 200$  mV. R557E construct was loss of function. Surprising was that in the presence of saturating concentrations of capsaicin  $V_{1/2}$  value of the TRPV1 mutant variants did not differ from the value of the wild-type receptor (fig. 5). These results may indicate that the voltage sensitivity in the presence of bound capsaicin is mediated by other residues than in the state without capsaicin. The  $V_{1/2}$  values of R557 mutants, which is the only positively charged residue in the S4 helix and is considered a main component of the voltage sensor, it is obvious that the localization of the positive charge in this region is not necessary in the presence of capsaicin (value of  $V_{1/2}$  for R557A, R557K are identical to the WT). Based on these results it is evident that arginine 557 can not be the only residue that forms a voltage sensor of TRPV1.

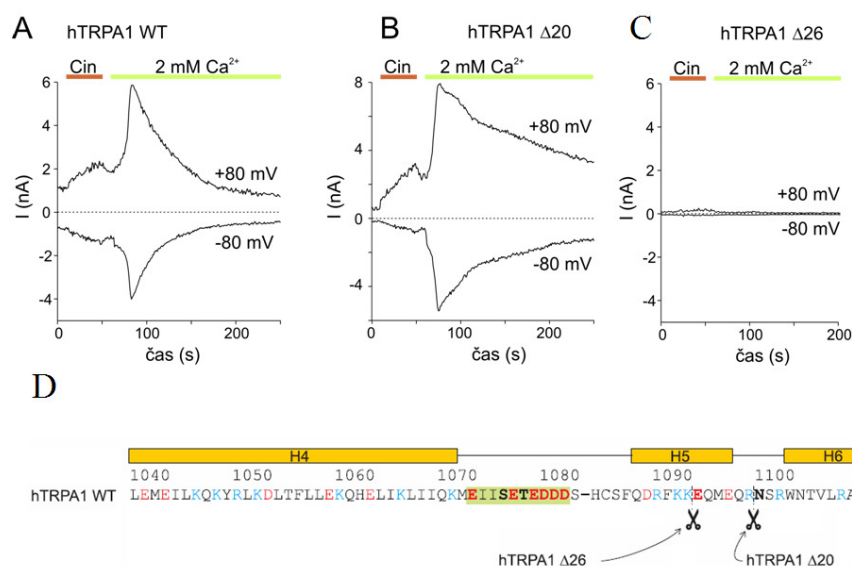


**Fig. 5: Voltage dependence of TRPV1 mutants.** A, Representative whole cell patch clamp current traces in response to a family of voltage steps in HEK293T cells transfected with wild-type TRPV1 in the absence (open symbols) or presence of 10  $\mu$ M capsaicin (filled symbols). B,  $V_{1/2}$  for wild-type TRPV1 and indicated mutants in the absence (open bars) or presence of 10  $\mu$ M capsaicin (filled bars). The asterisks indicate significance level. Under control conditions, some mutants did not reach half-maximal activation at voltages up to 200 mV. Each bar is the mean  $\pm$  S.E.

## The role of the C terminus of TRPA1 channel in $\text{Ca}^{2+}$ activation

At first we tested the overall structural requirements of the distal C terminus for channel activation, we introduced stop codons at E1094 and N1100, resulting in two C-terminal truncation mutants, TRPA1 $\Delta$ 20 and TRPA1 $\Delta$ 26. The conservation of the primary structure of this region and the residues chosen for mutagenesis are summarized and depicted in fig. 6D. Mutation TRPA1 $\Delta$ 26 did not produce measurable currents in response to any of the stimuli tested, thus preventing further evaluation (fig. 6C). In contrast,

functional channels were obtained with the TRPA1 $\Delta$ 20 truncation mutant (fig. 6B). Compared with wild-type TRPA1, this mutant exhibited slower inactivation upon the addition of 2 mM Ca<sup>2+</sup>. In other respects, this truncation mutant exhibited a normal degree of Ca<sup>2+</sup>-induced potentiation and a normal responsiveness to voltage and Cin (fig. 6B). The finding that truncation of the C terminus by a further six residues was deleterious indicates an important functional role for the distal part of the C terminus, particularly a likely structural role of the predicted H5 helix. These initial screenings identified the distal C terminus as a critical modulatory domain of TRPA1 involved in its Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation, and we therefore further examined whether the acidic region preceding this H5 helix could play its presumed role of a high affinity Ca<sup>2+</sup> sensing site.

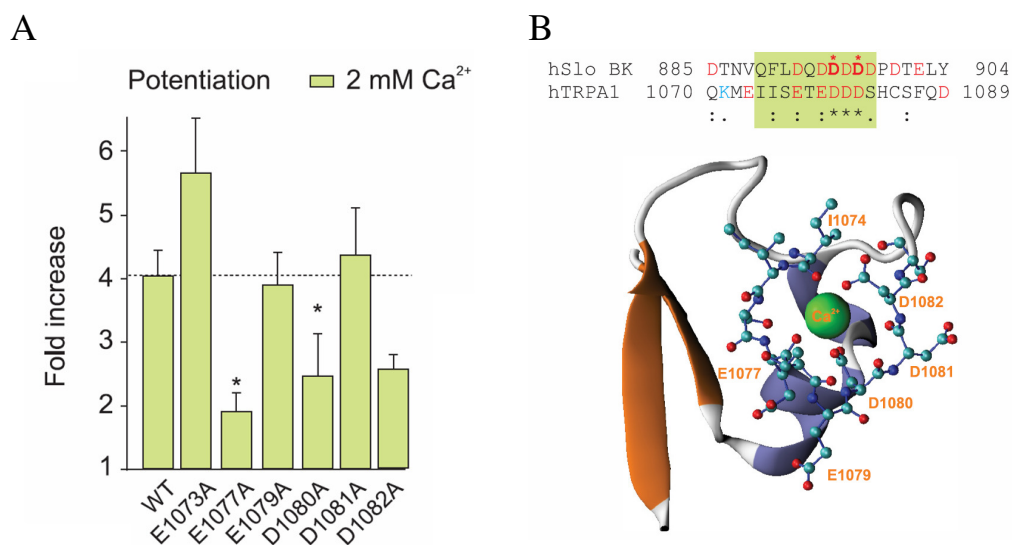


**Fig. 6: Truncations in C terminus reveal region involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation.** A, Time course of representative whole cell currents through WT human TRPA1 measured at -80 mV and +80 mV as marked. The application of 100  $\mu$ M Cin and subsequent addition of 2 mM Ca<sup>2+</sup> are indicated above. B and C, voltage-ramp protocol as in A used for truncation mutants. Note the obviously slower inactivation of the TRPA1 $\Delta$ 20 truncation mutant upon the addition of 2mM Ca<sup>2+</sup> to the bath solution compared with WT in A. C, TRPA1 $\Delta$ 26 truncation mutant did not produce measurable currents in response to any of the stimuli tested. D, The predicted secondary structure for hTRPA1 is indicated above the alignment. The region of interest is boxed. The residues in human TRPA1 that were mutated in this study are indicated in bold type.

We found out that the kinetics of the Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation were dramatically decreased in two out of the six charge-neutralized mutants: E1077A and D1080A. In five of ten D1080A-expressing cells that were treated with 2 mM Ca<sup>2+</sup>. These results indicate that the negatively charged residues in 1077 and 1080 (fig. 7A) is necessary for the natural extent of calcium potentiation of cinamal induced responses.



Molecular dynamics simulations indicate that C-terminal acidic cluster is capable of playing role of high affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site. The observations that D1080 indeed contributes to the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulation of TRPA1, together with the fact that substitutions at E1077 produced sensitized phenotypes, further supports the idea that the whole region containing the cluster of negative residues is structurally important and involved in the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulation of TRPA1. The results of computational experiment confirm that the calcium ion is bound in the structure and thus prove the ability of the acidic cluster from the TRPA1 C terminus to form a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain (fig. 7B).



**Fig. 7:** A, Calcium-induced potentiation was measured as the fold increase in current, measured at  $+80 \text{ mV} \pm \text{S.E.}$ , following the addition of  $2 \text{ mM}$  extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . The asterisks indicate significant differences between mutant and wild-type TRPA1. \*,  $p < 0.05$ , unpaired  $t$  test. B, Up: alignment of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain of potassium (BK) channel with C-terminal acidic region from human TRPA1. Below: Illustration of calcium-binding site in hSlo1-TRPA1 chimera with surrounding structures. Residues from the TRPA1 protein are shown in ball and stick representation.

## 6. DISCUSSION

### Mechanism of camphor sensitivity of TRPV1 channel

The outer pore domain represent the camphor-activation pathway in TRPV1 channel, particularly T633, a specific residue located in the middle of the pore helix that is also critical for direct activation of TRPV1 by protons (Ryu et al., 2007). Replacing T633 with alanine reduced camphor activation of the channel, while retaining the capsaicin responses. The TRPV1 chimera in which the N-terminal portion of the pore helix (Y627-C634) was replaced with its counterpart from TRPV2 was completely insensitive to camphor. This construct also lacked the stretch of nonconserved 15 amino acid residues between the turret and selectivity filter (T612-S626), and we show here that this region is



not important for camphor sensitivity, as has also been shown for other stimuli (capsaicin, protons, and heat). Our findings, together with the previous observations that the chimeric channel cannot be activated by protons and exhibits a markedly slower onset and offset of capsaicin responses, extend the proposal that the pore-helix domain represents a universal gating element common to various distinct activation modalities (Myers et al., 2008). The idea that the pore helix forms a movable barrier to ion flux that, depending on the protonation state of the channel, ultimately regulates channel opening is also supported by our observation that the chimeric channel was completely insensitive to depolarizing voltages. Our data showing that camphor occludes the potentiating effect of protons are consistent with the idea that it interacts with the proton-activation pathway directly (*i.e.*, the channel pore domain from the extracellular side). In addition, the experiments reported here demonstrate that the camphor activation/deactivation kinetics are remarkably fast and the potentiating effects are readily reversible, indicating a direct and extracellular site of action. To assess the potential mechanism of camphor interaction at TRPV1 and search for possible binding sites at TRPV1, we carried out a series of ligand docking experiments using two previously published homology models of the rat and human TRPV1 channel. Generally, the docking results proposed several possible docking sites for camphor. The first was predicted to be close to the intracellular part of the lipid-exposed face of transmembrane segments S1 and S2. The second docking pose was predicted to be in the pore loop region, close to the selectivity filter of TRPV1. These results increase the possibility that camphor directly binds TRPV1. In this regard, the existence of an extracellular interaction site is also supported by our observations that camphor exhibited a direct blocking effect, as could be seen from the partial current recovery upon washout.

## Functional and structural role S4-S5 region in temperature activated TRPV channels

The intrinsic mechanism by which thermosensitive TRPV channels are gated by voltage is not clear. Given that the S4–S5 domain is strongly conserved among TRPV channels, in particular, the positively charged residue in S4 is completely conserved across TRPV proteins, the new information obtained for TRPV1 may be important in understanding the structure-function relationships in related channels. On the other hand, to date, definitive proof that the S4–S5 region contributes to voltage-dependent gating has been only achieved for the TRPM8 channel (Voets et al., 2007), but now it appears that analogous mutations do not have the same effects in other, related TRP channels.

We identified two charged residues within the S4–S5 region, R557 and D576, that are involved in the voltage-dependent gating of TRPV1. These residues, together with E570 and R579, also contribute to the voltage

modulation of the capsaicin-induced currents. In E570Q and R579D, the voltages causing half-maximal activation ( $V_{1/2}$ ) were identical to the wild type, but their voltage-independent components of capsaicin-induced activation were distinct and different from the wild type. This might indicate that these two mutations at least partially uncouple voltage from chemical sensitivity. Consistent with these findings, a very recent study, comparing the energetics of thermal gating in absence and presence of membrane depolarization or chemical agonists, demonstrated that the activation of voltage sensors is not necessary for TRPV1 channel gating (Yao et al., 2010).

Our experiments on systematically replacing R579 with alanine, glutamate, or aspartate, and the partial functional recovery of the double mutant D576R/R579E, indicate that the local charge distribution around these two residues is critical for the voltage modulation of the capsaicin-activated states of the channel. Other interesting features arise from our data: a leftward shift in  $V_{1/2}$  and strong changes in the capsaicin-induced activation/ deactivation kinetics that was found for three distinct mutations distant in sequence: R557K, G563S, and for the previously reported gain-of-function mutant M581T (Myers et al., 2008), might support the proposed role of the S4–S5 segment as a modular domain that, depending on the stimulus context, mediates the channel activation and/or deactivation.

## The role of the C terminus of TRPA1 channel in $\text{Ca}^{2+}$ activation

We identify the residues within the distal C-terminal domain of the human TRPA1 that when mutated affect the  $\text{Ca}^{2+}$ - and voltage-dependent gating of channel. The first key finding of our study is that truncation of the C-terminal domain by 20 amino acids reduces the inactivation of the TRPA1 channel without altering its activation by the thiol-reactive compound cinnamaldehyde or the degree of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent potentiation. This result provides further support for the previous suggestion that the inactivation mechanism of TRPA1 is not coupled to activation/potentiation (Wang et al., 2008).

Together with our results, it appears that specific charged residues within the entire region between helices H4 and H5 may comprise an important functional unit which, depending on  $\text{Ca}^{2+}$  binding, transmits a chemical signal from the N terminus to the gate. The recent 16 Å resolution structure of TRPA1 indicates that covalent modifications within the N termini might bridge adjacent monomers and induce conformational changes in the cytoplasmic domains of TRPA1 that lead to channel gating (Cvetkov et al., 2011). By looking at this structure, it is tempting to speculate that the C-terminal helices forming a symmetrical structure parallel to the membrane plane might be stabilized by interactions between the positively charged region K988–R1011 and the acidic cluster of the adjacent subunit. Upon  $\text{Ca}^{2+}$  binding, this interaction is disrupted, which might result in the opening of the channel.

The next finding of this study provides essential evidence that the cluster of acidic residues in the TRPA1 cytosolic C terminus plays an important role in Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation and may represent a candidate region for the site of Ca<sup>2+</sup> binding. This portion of the TRPA1 protein does not possess a “classical” Ca<sup>2+</sup>-binding motif; thus our homology model cannot lend any direct structural support for identifying the Ca<sup>2+</sup>- binding site. However, this model does fit the requirements for the <sup>1074</sup>I ISETEDD<sup>1083</sup> motif being a Ca<sup>2+</sup>-binding loop; it provides a basis for additional structural insights into the possible receptor-Ca<sup>2+</sup> contacts and in general is consistent with our experimental results. According to our simulations, the two residues D1080 and D1082 are predicted to be crucial for binding calcium, whereas the side chains of I1074 and E1077 are in contact with the calcium ion using their main chain carbonyl oxygen atoms.

## 7. CONCLUSIONS

### Mechanism of camphor sensitivity of TRPV1 channel

Camphor modulates TRPV1 channel through the outer pore helix domain by affecting its overall gating equilibrium. In addition, camphor, which generally is known to decrease the fluidity of cell plasma membranes, may also regulate the activity of TRPV1 by inducing changes in the spatial distribution of PIP<sub>2</sub> on the inner leaflet of the plasma membrane. The findings of this study provide novel insights into the structural basis for the modulation of TRPV1 by camphor and may provide an explanation for the mechanism by which camphor modulates thermal sensation *in vivo*.

### Functional and structural role S4-S5 region in temperature activated TRPV channels

The charged residues in S4-S5 region contribute to voltage and capsaicin sensing in TRPV1 channel and, despite their highly conserved nature, regulate the temperature and chemical gating in the various vanilloid channels in different ways.

### The role of the C terminus of TRPA1 channel in Ca<sup>2+</sup> activation

The C-terminal acidic cluster is involved in the Ca<sup>2+</sup>-induced potentiation and inactivation of TRPA1. The conserved acidic motif in the C terminus is actively involved in TRPA1 regulation by Ca<sup>2+</sup>. Identification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent domain is important for understanding the role of TRPA1 in chemical nociception.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

1. Benedikt J, Samad A, Etrich R, Teisinger J, Vlachova V. Essential role for the putative S6 inner pore region in the activation gating of the human TRPA1 channel. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Research*. 2009;1793:1279-1288.
2. Bezanilla F. How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:323-332.
3. 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. *J Biol Chem*. 2010;285:41455-41462.
4. Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, Rosenmann E, Gonzalez-Nilo F, Latorre R. Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:10246-10251.
5. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*. 1999;398:436-441.
6. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389:816-824.
7. Catterall WA. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*. 2010;67:915-928.
8. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426:517-524.
9. Cvetkov TL, Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. Molecular Architecture and Subunit Organization of TRPA1 Ion Channel Revealed by Electron Microscopy. *J Biol Chem*. 2011;286:38168-38176.
10. Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods*. 2006;151:178-185.
11. Dittert I, Vlachová V, Knotková H, Vitásková Z, Vyklický L, Kress M, Reeh PW. A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods*. 1998;82:195-201.
12. Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem*. 2007;282:13180-13189.
13. Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A. Molecular modeling of the full-length human TRPV1 channel in closed and desensitized states. *J Membr Biol*. 2008;223:161-172.
14. Green BG. Sensory characteristics of camphor. *J Invest Dermatol*. 1990;94:662-666.
15. Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:8134-8139.
16. Klein RM, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Gordon SE. Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P2) is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J Biol Chem*. 2008;283:26208-26216.
17. Klein RM, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Gordon SE. Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation: PI(4,5)P2 is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J Biol Chem*. 2008.
18. Klein RR, Bourdon DM, Costales CL, Wagner CD, White WL, Williams JD, Hicks SN, Sondek J, Thakker DR. Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor u73122. *J Biol Chem*. 2011;286:12407-12416.

19. Kohno K, Sokabe T, Tominaga M, Kadowaki T. Honey bee thermal/chemical sensor, AmHsTRPA, reveals neofunctionalization and loss of transient receptor potential channel genes. *J Neurosci.* 2010;30:12219-12229.
20. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science.* 2005;309:903-908.
21. Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T. Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci.* 2007;27:7070-7080.
22. Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci.* 2006;32:335-343.
23. Matta JA, Ahern GP. Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol.* 2007;585:469-482.
24. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* 2002;416:52-58.
25. Myers BR, Bohlen CJ, Julius D. A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron.* 2008;58:362-373.
26. Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci.* 2005;25:4052-4061.
27. Nilius B, Prenen J, Owsianik G. Irritating channels: the case of TRPA1. *J Physiol.* 2011;589:1543-1549.
28. Oseguera AJ, Islas LD, Garcia-Villegas R, Rosenbaum T. On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel. *Biophys J.* 2007;92:3901-3914.
29. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 2002;108:705-715.
30. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science.* 2002;296:2046-2049.
31. Qin F. Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Handb Exp Pharmacol.* 2007:509-525.
32. Ryu S, Liu B, Yao J, Fu Q, Qin F. Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci.* 2007;27:12797-12807.
33. Samad A, Sura L, Benedikt J, Etrich R, Minofar B, Teisinger J, Vlachova V. The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochem J.* 2011;433:197-204.
34. Schmidt M, Dubin AE, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron.* 2009;64:498-509.
35. Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol.* 2006;128:509-522.
36. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 2003;112:819-829.
37. Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V. C-terminal acidic cluster is involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J Biol Chem.* 2012;287:18067-18077.

38. Ursu D, Knopp K, Beattie RE, Liu B, Sher E. Pungency of TRPV1 agonists is directly correlated with kinetics of receptor activation and lipophilicity. *Eur J Pharmacol.* 2010;641:114-122.
39. van der Wal J, Habets R, Varnai P, Balla T, Jalink K. Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2001;276:15337-15344.
40. Villalba-Galea CA, Sandtner W, Starace DM, Bezanilla F. S4-based voltage sensors have three major conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:17600-17607.
41. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature.* 2004;430:748-754.
42. Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B. TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol.* 2007;3:174-182.
43. Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol.* 2007;151:530-540.
44. Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol Chem.* 2008;283:32691-32703.
45. Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci.* 2005;25:8924-8937.
46. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature.* 2002;418:181-186.
47. Yao J, Liu B, Qin F. Kinetic and energetic analysis of thermally activated TRPV1 channels. *Biophys J.* 2010;99:1743-1753.
48. Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, Uysal S, Pfeifer JD, Riccio A, Clapham DE. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:18114-18119.
49. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>. *Nat Neurosci.* 2007;10:277-279.

## 9. SEZNAM PUBLIKACÍ/SELECTED PUBLICATIONS

### 1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impakt faktorem

Marsakova L, Touska F, Teisinger J, Vlachova V. Pore helix domain is critical to camphor sensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 channel. *Anesthesiology*. 2012; 116(4):903-917. (IF = 5.359, year: 2011)

Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V. C-terminal acidic cluster is involved in the Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of the human TRPA1 channel. *J Biol Chem*. 2012; 287(20):18067–18077. (IF = 4.773, year: 2011)

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. *J Biol Chem*. 2010; 285:41455-41462. (IF = 5.328, year: 2010)

Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. A "cute" desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011; 12:122-129. (IF = 2.805, year: 2011)

b) bez impakt faktoru

Marsakova L, Vlachova V. Kafr: Účinná látka s neznámým mechanismem působení. *Bolest*. 2012; ročník 15, číslo 1:16-22

### 2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s impakt faktorem

Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, Slamova A, Schejbalova M, Soucek P. Superoxide Dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas*. 2011; 40(1):72-8. (IF=2.733)

## 10. CURRICULUM VITAE

kontakt: marsakova@biomed.cas.cz

### Vzdělání

**2008 – současnost** doktorské studium, studijní program Fyziologie živočichů, PřF UK v Praze

*Disertační práce:* ***Modulační mechanismy nociceptivních TRP kanálů***

Pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.,  
Oddělení buněčné neurofyziologie

Školitelka/konzultant: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc./ RNDr. Jan Krůšek,  
Ph.D.

Využívané metody: fluorescenční (FRET, Ca<sup>2+</sup>-imaging),  
elektrofyzilogické (patch clamp), molekulárně-  
biologické metody, tkáňové kultury

**2006 – 2008** navazující magisterské studium, Biochemie, PřF UK  
(SZZ z biochemie, molekulární biologie, fyzikální  
chemie a klinické biochemie)

*Diplomová práce:* ***Úloha polymorfismů vybraných biotransformačních  
enzymů v genotoxicitě a karcinogenezi***

Pracoviště: Státní zdravotní ústav, Odborná skupina  
biotransformací

Školitel: RNDr. Pavel Souček, CSc.

Využívané metody: izolace DNA, reverzní transkripce, UV-VIS  
spektrofotometrie, PCR, real-time PCR, RFLP,  
horizontální gelová elektroforéza

**2003 - 2006** bakalářské studium, Biochemie, PřF UK  
(SZZ z biochemie, fyzikální chemie, organické chemie,  
anorganické chemie a analytické chemie)

*Bakalářská práce:* ***Přístupové cesty k aktivnímu místu cytochromů P450***

Pracoviště: katedra biochemie

Školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Využívané metody: rešerše, Pymol



# CURRICULUM VITAE

Contact: marsakova@biomed.cas.cz

## Education

**2008 – present:** Ph.D. Study  
Occupational skills covered: FRET, Ca<sup>2+</sup>-imaging, molecular biology, electrophysiology (patch clamp)

Name of organisation providing education and training: Charles University in Prague and Department of Cellular Neurophysiology and Institute of Physiology AS CR v.v.i.

PhD thesis: *Modulatory mechanisms of nociceptive TRP channels*

Supervisor: Viktorie Vlachová, RNDr., DrSc.

Consultant: Jan Krůšek, RNDr., Ph.D.

**2007 - 2008:** Master's degree Study  
Occupational skills covered: allelic discrimination: DNA isolation, reverse transcription, Real time PCR, PCR, RFLP analysis

Name of organisation providing education and training: Faculty of Science, Department of Biochemistry, Charles University in Prague and The National Institute of Public Health, Toxicogenomics Unit, Prague

Diploma thesis: *Role of polymorphisms in selected biotransformation enzymes in genotoxicity and carcinogenesis*

Supervisor: Pavel Souček, RNDr., Ph.D.

**2003 - 2006:** Bachelor's degree Study  
Occupational skills covered: review, Pymol

Name of organisation providing education and training: Faculty of Science, Department of Biochemistry, Charles University in Prague

Bachelor thesis: *Cytochromes P450 access channels towards the enzyme active centre*

Supervisor: Prof. Petr Hodek, RNDr., Ph.D.