

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Strukturální podstata mezidruhových rozdílů v aktivaci TRPA1
receptoru**

**Structural basis for interspecies differences in the TRPA1 receptor
activation**

Bakalářská práce

Viktor Synytsya

Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.
Školitel specialista: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Viktorie Vlachové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

.....

Viktor Synytsya

Poděkování:

Rád bych v první řadě poděkoval své školitelce, paní doktorce Viktorii Vlachové, za podporu při řešení bakalářské práce, pozitivní přístup a pracovní nasazení, které jsem od ní mnohdy přejal. Velký dík patří také Aničce Hynkové za věcné rady ohledně práce v laboratoři a průběžné opravy, které mě přiměly k nasazení pracovního tempa. V neposlední řadě děkuji vedoucímu práce, panu docentu Miroslavu Šulcovi, za poznámky a rady k bakalářské práci.

Abstrakt

Ankyrinový receptor TRPA1 je excitační iontový kanál, který zajišťuje převod nocicepčních podnětů na primárních aferentních senzoričských neuronech u savců i nižších organismů. Současný výzkum strukturních a funkčních vlastností TRPA1 přináší stále více důležitých poznatků o struktuře a funkci tohoto receptoru, významné mezidruhové rozdíly však často znemožňují jejich přímé porovnání. Naproti tomu, tyto mezidruhové rozdíly mohou být hlavním vodítkem pro identifikaci významných funkčních domén. Cílem práce je zpracovat souhrnný přehled současných poznatků o funkčních a strukturních vlastnostech lidského TRPA1 receptoru a charakterizovat hlavní rozdíly, kterými se liší od jiných orthologů TRPA1 u různých živočišných druhů.

Experimentální část se zaměřuje na porovnání aktivačních vlastností lidského TRPA1 receptoru a chiméry, ve které je zaměněna 5. transmembránová doména za homologní oblast TRPA1 receptoru octomilky. Výsledky získané pomocí elektrofyziologické techniky *patch-clamp* prokazují, že proudové odpovědi aktivované změnami membránového potenciálu jsou významně sníženy u chimérického receptoru, což prokazuje klíčovou úlohu této oblasti pro správnou funkci iontového kanálu. (In Czech)

Klíčová slova: ankyrinový receptor, iontový kanál, nocicepce, senzoričský neuron, struktura-funkce

Abstract

Ankyrin transient receptor potential channel TRPA1 is an excitatory ion channel that transduces nociceptive information on primary afferent sensory nerves of mammals and other organisms. Structure function studies on TRPA1 are valuable for understanding the mechanisms of channel activation and for specific drug discovery efforts, however, significant interspecies differences hamper direct transfer of findings in animals to human. On the other hand, the interspecies differences may prompt identification of many important functional domains. The aim of this bachelor thesis is to give an overview of recent evidence regarding the functional and structural properties of human TRPA1 ion channels from the point of view of the comparison of the most important interspecies differences among TRPA1 orthologs.

The experimental part is focused on the comparison of activation properties of human TRPA1 channel with a chimera in which the fifth transmembrane region was replaced by that from *Drosophila melanogaster*. The presented results obtained by electrophysiological technique *patch-clamp* demonstrate that outward membrane currents induced by depolarizing voltage are significantly reduced in chimera, which indicates an important role of the fifth transmembrane domain in TRPA1 channel gating. (In Czech)

Key words: ankyrin receptor, ion channel, nociception, sensory neuron, structure-function

Obsah

Seznam zkratk	7
1. Úvod	9
1.1 TRPA1 receptor – molekulární struktura	10
1.1.1 N-konec – ankyrinová doména TRPA1	10
1.1.2 Transmembránová oblast TRPA1	12
1.1.3 C-koncová část TRPA1	13
1.2 Aktivátory TRPA1 receptoru	13
1.2.1 Aktivace TRPA1 elektrofilními činidly	14
1.3 Strukturní podstata mezidruhových rozdílů	15
1.4 Vlastnosti orthologů TRPA1	16
1.4.1 Hmyzí TRPA1	16
1.4.2 Lidský TRPA1	18
1.5 Vliv depolarizace membránového potenciálu na aktivaci TRPA1	18
2. Cíle práce	20
3. Materiál a metody	21
3.1 Chemikálie	21
3.2 Biologický materiál	21
3.3 Přístroje a pomůcky	22
3.4 Roztoky	22
3.5 Transformace XL10-Gold ultrakompetentních buněk kmene <i>E. coli</i> metodou teplotního šoku	23
3.6 Izolace plasmidové DNA a následné ověření sekvenací	24
3.7 Tkáňové kultury a transfekce	24
3.8 Elektrofyziologická technika <i>patch-clamp</i>	25
3.9 Aktivace TRPA1 depolarizačním napětím	27
3.10 Hodnocení záznamů a statistická analýza	28
4. Výsledky	31
4.1 Amplifikace plasmidu hTRPA1-dTM5 v buňkách <i>E. coli</i>	31
4.2 Transfekce buněk HEK 293T	31
4.3 Proudově-napěťová charakteristika hTRPA1 - porovnání napěťových protokolů	32
4.4 Aktivace chiméry hTRPA1-dTM5 depolarizujícím napětím	33
4.5 Porovnání aktivačních parametrů konstruktů	35
4.6 Vyhodnocení kinetiky aktivace	36
4.7 Vyhodnocení kinetiky deaktivace	36
4.8 Aktivace skořicovým aldehydem	39
5. Diskuse	41
6. Závěr	44
7. Použitá literatura	45

Seznam zkratek

AITC	allylisoithiokyanát
AK	aminokyselina
cDNA	DNA, vzniklá zpětným přepisem z RNA (z anglického „complementary DNA“)
Cin	skořicový aldehyd (z anglického „cinnamaldehyde“)
CMV promotor	promotor (Cytomegalovirus)
dTRPA1	ortholog TRPA1 receptoru octomilky
EC ₅₀	poloviční účinná koncentrace (z anglického „half maximal effective concentration“)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z anglického „ethylenediaminetetraacetic acid“)
EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová (z anglického „ethyleneglycoltetraacetic acid“)
FBS	fetální bovinní sérum (z anglického „fetal bovine serum“)
GFP	zelený fluorescenční protein (z anglického „green fluorescent protein“)
H1-H6	helikální segmenty TRPA1 receptoru na C-konci
HEK	lidské embryonální ledvinné buňky (z anglického „human embryonic kidney cells“)
HEPES	kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová (z anglického „(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid“)
hTRPA1	lidský ortholog TRPA1 receptoru
hTRPA1-dTM5	lidský TRPA1 receptor, který má pátou transmembránovou doménu zaměněnou za segment homologní části TRPA1 orthologu octomilky obecné
CHO	linie ovariálních buněk křečka čínského
LB médium	kultivační médium pro bakterie (z anglického „lysogeny broth“)
MgATP	adenosintrifosfát hořečnatý

mRNA	mediátorová RNA (z anglického „messenger RNA“)
mTRPA1	myší ortholog TRPA1 receptoru
NCBI	Národní Centrum Biotechnologických informací (z anglického „National Center for Biotechnology Information“)
PBS	fosfátový pufr (z anglického „phosphate buffered saline“)
RPM	otáčky za minutu (z anglického „revolutions per minute“)
rTRPA1	potkaní ortholog TRPA1 receptoru
TM - TRPA1	transmembránový segment TRPA1 receptoru
TRP	přechodný receptorový potenciál (z anglického „transient receptor potential“)

1. Úvod

Schopnost rozpoznat potenciálně nebezpečné podněty z okolí je společně se smyslovým vnímáním nezbytná pro přežití každého organismu. Klíčovou úlohu v rozpoznávání vnějších signálů a jejich převodu na nervové vzruchy (tzv. transdukcii) mají specializované membránové receptory, exprimované na periferních zakončených primárních aferentních sensorických neuronů. Významnou skupinou transdukčních molekul, které zajišťují detekci teplotních, osmotických, chemických i mechanických podnětů, je rozsáhlá rodina iontových kanálů nazývaných „Transient Receptor Potential“ (dále TRP). Savčí TRP kanály jsou kódovány 28 geny a podle homologie jsou klasifikovány do šesti hlavních podrodin: kanonické (TRPC), vaniloidní (TRPV), melastatinové (TRPM), ankyrinové (TRPA), polycystinové (TRPP) a mukolipinové (TRPML) [1, 2]). Společnou charakteristikou těchto iontových kanálů je homotetramerní uspořádání receptorových podjednotek o šesti transmembránových doménách a cytoplasmatickém N- a C- konci. TRPA1 receptor je jediným zástupcem savčí TRPA podrodiny [1]. V porovnání s ostatními TRP receptory se vyznačuje vysokým počtem (15-17) ankyrinových repetitivních jednotek na N-konci. Komplementární DNA (cDNA) genu kódujícího TRPA1 byla poprvé získána z lidských fibroblastů v roce 1999 [3], autorům se však u exprimovaného proteinu nepodařilo prokázat funkci iontového kanálu.

Jako první byla roku 2003 zaznamenána chemická a chladová aktivace myšího orthologu TRPA1 (mTRPA1) v expresním systému CHO (linie ovariálních buněk křečka čínské) a prokázána výrazná a specifická exprese v neuronech ganglií zadních kořenů míšních [4]. Významná exprese TRPA1 na úrovni mRNA i na úrovni proteinu byla postupně prokázána nejen v nervových buňkách, ale také ve vláskových buňkách sluchového orgánu a v keratinocytech. Fyziologická úloha TRPA1 receptoru dosud není známa, ale lze předpokládat, že bude záviset na typu tkáně, ve které se nachází. Například v endoteliálních buňkách kardiovaskulárního systému se TRPA1 účastní roztažení cév [5], v gastrointestinálním traktu moduluje permeabilitu membrány a sekreci aniontů [6], v inervovaných kožních buňkách vyvolává zarudnutí pokožky při zánětu [7].

TRPA1 jako polymodální receptor je aktivován celou řadou různých podnětů: chladem [8], mechanickou stimulací [9], dráždivými chemickými látkami [10], zvýšenou intracelulární koncentrací vápenatých iontů [11], nebo účinkem mediátorů zánětu [12]. Orthology TRPA1 různých živočišných druhů se vzájemně liší v primární struktuře,

přičemž tyto rozdíly mohou být podkladem rozdílné citlivosti k agonistům. Pro některé orthology tak může mít stejný aktivátor různou prahovou hodnotu, nebo dokonce vykazovat protichůdné účinky [13].

1.1 TRPA1 receptor – molekulární struktura

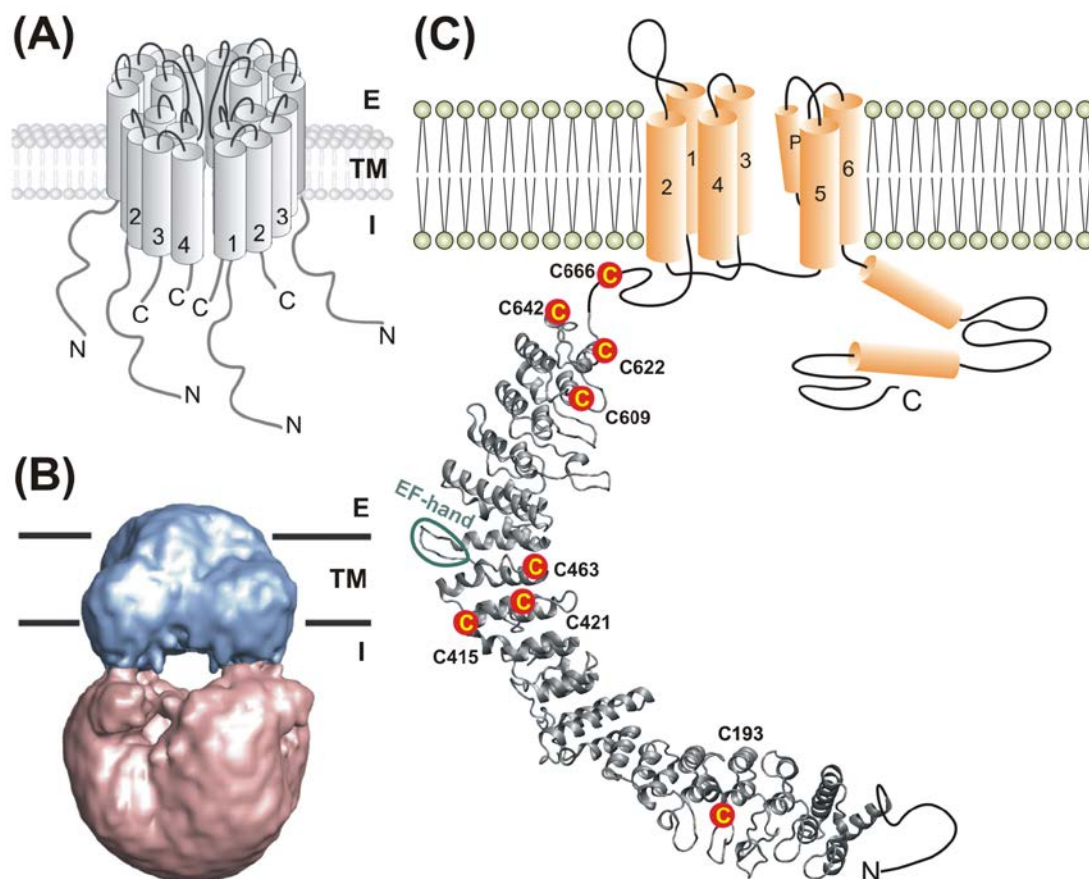
Iontový kanál TRPA1 je homotetramerem symetricky uspořádaných TRPA1 receptorových podjednotek. Každá podjednotka je topologicky uspořádána do šesti helikálních transmembránových segmentů (TM1-TM6) a cytoplasmaticky orientovaného C- a N- konce (obr. 1.A na str. 11). Orthology jednotlivých živočišných druhů se navzájem liší v počtu aminokyselin (lidský TRPA1 obsahuje v sekvenci 1119 aminokyselin (AK), myší TRPA1 1115 AK a TRPA1 octomilky 1197 AK). Transmembránová doména je napříč TRP podrodinami vysoce konzervovaná, což pravděpodobně souvisí se sdílením podobného vrátkovacího mechanismu. Větší rozdíly v primární struktuře vykazují cytoplasmatické konce, které jsou zřejmě zodpovědné za specifické vlastnosti jednotlivých podtypů TRP receptorů.

Nové poznatky o molekulárním uspořádání kanálu TRPA1 přinesla studie v roce 2011, kdy byla pomocí elektronové mikroskopie s rozlišením 16 Å popsána struktura myšího orthologu (obr. 1.B na str. 11) [14]. Kanál o molekulové hmotnosti 525 kDa je tvořen čtyřmi podjednotkami, vzájemně spojenými disulfidickými můstky. Strukturu TRPA1 lze rozdělit na transmembránovou část se selektivním filtrem a cytoplasmatickou část, která je uspořádána do kompaktního „zavěšeného košíku“. Další poznatky o architektuře TRPA1, stejně tak jako o možném mechanismu aktivace, bude v nejbližší době možné získat porovnáním TRPA1 se strukturou příbuzného kanálu TRPV1, jenž byla určena v atomárním rozlišení 3,4 Å kryoelektronovou mikroskopií [15, 16].

1.1.1 N-konec – ankyrinová doména TRPA1

N-konec TRPA1 představuje 64% celkové velikosti TRPA1 proteinu [14]. Obsahuje ankyrinovou doménu zahrnující patnáct až sedmnáct ankyrinových repetic, což je hlavní rozdíl mezi TRPA1 a ostatními podrodinami TRP kanálů. Ankyrinová repetice je krátká sekvence, tvořená zpravidla 33 aminokyselinami, jejíž sekundární strukturu vytvářejí dvě antiparalelní α -šroubovice spojené β -otáčkou. Ankyrinové domény patří mezi jedny z nejběžnějších strukturních motivů proteinů prokaryotních i eukaryotních organismů a je jim připisována úloha tvorby protein-proteinových interakcí. Na N-konci se

nachází několik konzervovaných cysteinových reziduí (Cys) zodpovědných za vazbu elektrofilních látek kovalentní vazbou. Pro myší ortholog jsou to Cys415, Cys421, Cys622, Cys642 a Cys666, (obr. 1.C) [17-19]. Vzdálenosti a prostorové orientace cysteinů umožňují vznik disulfidických můstků. Jedná se o dvě rezidua v ankyrinové doméně - Cys193 a Cys463, druhá dvojice se nachází na spoji mezi poslední ankyrinovou doménou



Obr. 1: Struktura TRPA1. (A) Tetramerické uspořádání TRPA1, vytvářející iontový kanál. Pór kanálu, nacházející se v transmembránové oblasti (TM), je tvořen 5. a 6. transmembránovými doménami a pórovými helixy, směřujícími do extracelulárního prostoru (E). N- a C-konce směřují do intracelulárního prostoru (I). (B) Kryoelektronová struktura TRPA1 kanálu v rozlišení 16 Å. Modře je vyznačena transmembránová oblast, růžově cytoplasmatická část proteinu, tvořící vnitřní dutinu (převzato a upraveno podle [20]). (C) Schematické znázornění TRPA1 receptorové podjednotky s důrazem na N-konec. Receptor je složen z šesti transmembránových domén (1-6) spojených kličkami. Extracelulární klička mezi 5. a 6. transmembránovou doménou obsahuje krátký pórový helix (P). N-konec je tvořen 15 - 17 ankyrinovými repeticemi, ve kterých se nacházejí cysteinová rezidua (červené kruhy), zodpovědná za chemickou aktivaci TRPA1 elektrofilními látkami a za tvorbu disulfidických můstků. Součástí N-konce je doména EF-hand (zeleně), která zprostředkovává citlivost receptoru na Ca^{2+} ionty. C-konec obsahuje několik helikálních částí (převzato a upraveno podle [21]).

a prvním transmembránovým segmentem - Cys609 a Cys666. U myšího orthologu TRPA1 se mohou alternativně vyskytovat celkem čtyři disulfidické můstky, konkrétně Cys666-Cys622, Cys666-Cys463, Cys666-Cys193 a Cys622-Cys609 [22]. Vzájemnou reakcí se tak vytvoří „kapsa“, která zřejmě chrání reaktivitu dalších cysteinových reziduí [23]. Předpokládá se, že kovalentní modifikace uvnitř této kapsy vedou k narušení interakcí v rámci jedné podjednotky, případně mezi podjednotkami, což vede ke konformačním změnám v cytoplasmatické doméně a modulaci vrátkovacího mechanismu [24]. Disulfidické můstky tak hrají významnou roli v aktivaci a desenzitizaci kanálu [14, 22].

Na N-konci ve 12. ankyrinové doméně (Asp468 až Leu480 u lidského TRPA1), je další, mezidruhově konzervovaný motiv, který byl pro svůj charakteristický tvar pojmenován „EF hand“. Slouží jako vazebné místo pro Ca^{2+} ionty, čímž umožňuje přímou aktivaci TRPA1 receptoru vápenatými ionty v intracelulárním prostoru [25]. TRPA1 dále může být aktivován kyslíkem vazbou na prolylový hydroxylační motiv v 10. ankyrinové doméně prostřednictvím prolyl hydroxylasy [23].

1.1.2 Transmembránová oblast TRPA1

Transmembránová oblast TRPA1 receptoru je tvořena asi 22% celkové délky proteinu [20] a je nejkonzervovanější částí v porovnání s ostatními částmi molekuly. Je tvořena šesti transmembránovými helixy (TM1-TM6), které jsou spojeny extracelulárními a intracelulárními kličkami. Segmenty TM5 a TM6 spolu s kličkou mezi nimi, obsahující pórový helix TRPA1, vytvářejí centrální pór kanálu. Tato oblast má významnou funkční úlohu:

- a) obsahuje selektivní filtr, který určuje selektivitu a propustnost iontového kanálu pro jednomocné a dvojmocné kationty,
- b) je hlavní součástí vrátkovacího mechanismu [26].

Na základě elektrofyziologické metody *patch-clamp* a techniky *calcium imaging* byla určena některá rezidua, ovlivňující propustnost kanálu pro extracelulární vápenaté ionty. Glutamát Glu923 na vnější straně póru vytváří mikrodoménu pro Ca^{2+} ionty [27], aspartát Asp918 je důležitým aminokyselinovým zbytkem určujícím relativní propustnost pro dvojmocné ionty [11]. Záměnou záporně nabitého aspartátu za nepolární alanin v oblasti selektivního póru (Asp918Ala u potkaního orthologu rTRPA1) bylo dosaženo

výrazného snížení relativní propustnosti kanálu pro Ca^{2+} ionty [11]. Propustnosti pro větší organické kationty bylo dosaženo deletrující aktivací TRPA1 ligandy [27].

Vrátkovací mechanismus TRPA1 kanálu je intenzivně studován, dosud však není zcela objasněn. Řada současných studií vychází ze strukturální podobnosti TRP iontových kanálů s draselnými kanály, pro které jsou dostupné krystalové struktury a homologní modely v různých konformacích. Některé studie podporují představu podobné molekulární podstaty vrátkovacího mechanismu zahrnujícího pohyb kladně nabitého TM4 transmembránového helixu směrem vně z plasmatické membrány a roztažení C-konců TM6 [28]. Naproti tomu rozsáhlá studie, v níž byla použita řada chimér vzniklých kombinací draselného kanálu Kv2.1 se dvěma zástupci TRP receptorů - TRPM8 a TRPV1 - ukázala, že nízká homologie mezi TRP receptory a draselnými kanály neumožňuje vzájemnou modulární záměnu funkčně významných domén [29].

1.1.3 C-koncová část TRPA1

C-konec představuje nejkratší doménu TRPA1 receptoru (14% celkové velikosti). Společně s N-koncem formuje intracelulární dutinu, ovlivňující aktivaci kanálu. Na C-konci se nachází šest krátkých helikálních segmentů (H1-H6), které se podílí na chemické a napěťové aktivaci [30]. Značné množství záporně nabitých reziduí, koncentrovaných na krátkém úseku karboxylového konce (Glu1073, Glu1077, Asp1080, Asp1081, Asp1082), pravděpodobně představuje vazebné místo pro vápenaté ionty [31].

1.2 Aktivátory TRPA1 receptoru

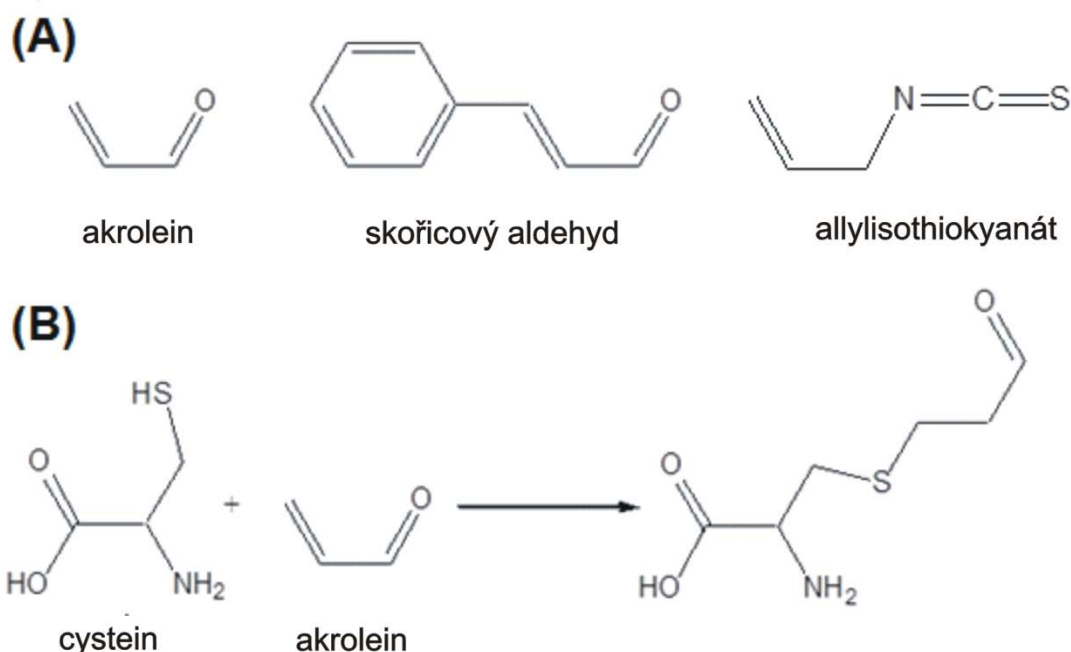
TRPA1 receptor je polymodální senzor, aktivovaný celou řadou fyzikálních a chemických podnětů. Míra aktivace receptoru daným podnětem se u jednotlivých živočišných druhů liší. Aktivátory TRPA1 lze rozdělit podle jejich původu na endogenní a exogenní. TRPA1 může být aktivován:

1. elektrofilními látkami (skořicový aldehyd (dále Cin), akrolein),
2. látkami neelektrofilní povahy (menthol, kofein, Δ -9-tetrahydrocannabinol),
3. mediátory zánětu (4-hydroxynonenal, bradykinin),
4. intracelulárními Ca^{2+} kationty,
5. teplem,
6. chladem,

7. depolarizujícím napětím,
8. mechanickou stimulací.

1.2.1 Aktivace TRPA1 elektrofilními činidly

Atomy elektrofilních činidel se sníženou elektronovou hustotou atakují thiolové skupiny cysteinu nebo aminové skupiny bazických aminokyselin TRPA1 receptoru. Pro aktivaci jsou klíčové zejména cysteiny nacházející se na ankyrinovém N-konci, u kterých byla prokázána kovalentní modifikace těmito činidly [17]. Samotná aktivace probíhá několika způsoby, například alkylací cysteinu (jodoacetamid) nebo tvorbou disulfidické vazby (peroxid vodíku). U α,β - nenasycených aldehydů, jako jsou například akrolein, skořicový aldehyd nebo allylisothiokyanát (dále AITC) (obr. 2.A), je nenasycená vazba atakována nukleofilní merkapto-skupinou cysteinu, případně aminovou skupinou lysinu (Lys708 u lidského orthologu TRPA1 (dále hTRPA1) [2]), mechanismem známým jako Michaelova adice (obr. 2.B). Míra účinku aktivátoru na receptor závisí na jeho reaktivitě, stálosti vzniklé vazby a také na jejich partičním koeficientu P , který udává rovnovážný podíl koncentrací neionizované látky, rozdělené mezi rozpouštědly oktanol-voda.

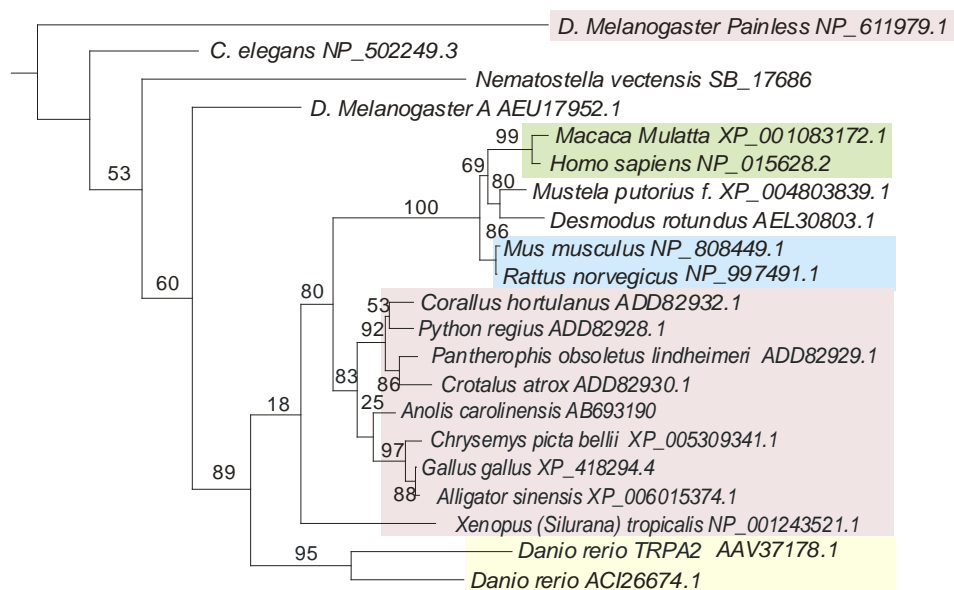


Obr. 2: (A) Struktura některých elektrofilních aktivátorů TRPA1 – akroleinu, skořicového aldehydu a allylisothiokyanátu. (B) Ukázka reakce elektrofilního činidla s cysteinem. Thiolová skupina na cysteinu elektrofilně napadá β -uhlík na akroleinu. Reakce probíhá mechanismem zvaným Michaelova adice a je bazicky katalyzována.

1.3 Strukturální podstata mezidruhových rozdílů

Funkční TRPA1 iontový kanál se podařilo exprimovat teprve v nedávné době, není tedy dosud příliš prozkoumaný. Vzhledem k jeho polymodálním vlastnostem a umístění v nervových drahách přenášejících bolestivé podněty jsou intenzivně studovány jeho strukturální, funkční a fyziologické vlastnosti. Nové poznatky jsou využívány pro vývoj nových látek, které regulují funkci TRPA1 a mohly by se stát léky s analgetickými účinky [2, 32].

Ukazuje se, že orthology modelových zvířecích organismů se od lidského mohou kvůli strukturálním rozdílům lišit v citlivosti vůči aktivátorům a v některých případech i v samotném mechanismu účinku. Příkladem mohou být odlišná působení mentholu a kofeinu na hTRPA1 a mTRPA1 [33, 34], nebo rozdíl mezi teplotně necitlivým lidským TRPA1 a plazími orthology, které jsou aktivované teplem [35]. Odlišná citlivost různých živočišných druhů k aktivátorům TRPA1 je dána nejen strukturálními rozdíly mezi vazebnými či interakčními místy proteinového komplexu, ale také buněčným typem, ve kterém je TRPA1 exprimován.



Obr. 3: Fylogenetický strom podrodiny TRPA proteinů. Hodnoty (bootstrap), které vyjadřují stupeň statistické podpory jednotlivých větvení, jsou uvedeny v procentech. Pro konstrukci fylogramu byl použit server [36], metoda PhyML, sekvenční uspořádání metodou ProbCons pro transmembránové oblasti TRPA proteinů. Identifikační kódy jednotlivých orthologů odpovídají primárním sekvencím uvedených v databázi NCBI (National center for Biotechnology Information, [37]). Vpravo jsou napsány aktivační podněty, které byly pro uvedené orthologní receptory charakterizovány – elektrofilní látky (E), teplo (T), chlad (CH), menthol (M), kofein (C), mediátory zánětu (Z).

Jednou z účinných metod sledování vývojových vztahů mezi orthology je fylogenetický rozbor (obr. 3 na str. 15). Z fylogenetických modelů bylo zjištěno, že vývoj a diversifikace všech TRPA1 orthologů začal přibližně před 500 miliony let z jedné proteinové sekvence, která již obsahovala šest hlavních cysteinových reziduí [38]. TRPA1 receptor byl zřejmě zpočátku využíván jako detektor škodlivých elektrofilních látek, další funkce se objevily až v důsledku evoluce. Důsledkem evoluce zřejmě došlo ke strukturním změnám TRPA1, a tím i ke změně jeho funkce. Zatímco u ryb je dokázána pouze aktivace TRPA1 elektrofilními látkami [39], u plazích a ptačích orthologů TRPA1 je známá také citlivost na teplo [35, 40]. Savčí TRPA1 jsou oproti evolučně starším živočichům citlivé na neelektrofilní látky, jako je například menthol [34] nebo kofein [33]. Z hlediska fyziologické funkce TRPA1 jsou zajímavou skupinou živočichů hlodavci, u kterých má TRPA1 funkci chladového senzoru [41, 42], několika vědeckými týmy však tento způsob aktivace nebyl potvrzen [8, 35].

Porovnáním primárních struktur a přípravou chimérických konstruktů, které kombinují homologní sekvence orthologních TRPA1 proteinů s výrazně rozdílnými citlivostmi k aktivačním podnětům, se řadě laboratoří podařilo určit klíčové funkční domény nezbytné pro aktivaci TRPA1 receptoru mentholem [34], chladem [8] či teplem [35].

Citlivost TRPA1 receptoru k danému typu podnětu nemusí mít nutně souvislost s podobnými vlastnostmi orthologu TRPA1 vývojově staršího druhu. Příkladem může být tepelná aktivace TRPA1 orthologů much a hadů, schopných vnímat infračervené záření, u kterých se, zřejmě v důsledku selekčního tlaku, vyvinula nezávisle na sobě citlivost na teplo [43].

1.4 Vlastnosti orthologů TRPA1

1.4.1 Hmyzí TRPA1

Hmyz jako experimentální model je pro krátký generační čas, nenáročnost chovu a nízké laboratorní náklady často využíván ke studiu fyziologických procesů a základních nervových drah na molekulární a genetické úrovni. Jedním z nejpožívanějších a nejvíce prozkoumaných zástupců je octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*).

Octomilka patří vedle hlístů k jednomu z vývojově nejstarších živočichů, u kterých se vyskytují TRPA1 receptory (dTRPA1). dTRPA1 receptor je významně exprimován v multidendrických nociceptivních sensorických neuronech. Nachází se také v tepelně aktivovaných předních nervových buňkách mozku (anglicky „anterior cell neuron“), které společně s mechanismy chladové citlivosti zprostředkovávají selekci úzkého teplotního optima, nezbytného pro přežití živočicha [44].

Octomilka exprimuje několik typů TRPA kanálů, jejichž funkce závisí na typu tkáně. Gen pro TRPA1 obsahuje specifické exony, kódující domény citlivé na tepelné podněty. Alternativním sestřihem exonů jsou produkovány čtyři dTRPA1 isoformy (A, B, C, D), lišící se svými fyziologickými vlastnostmi. Sekvence na C-konci o délce 37 AA, kódovaná jedním z exonů, je společná pro dTRPA1-A a dTRPA1-D a je klíčová pro tepelnou aktivaci TRPA1 [45]. Obě isoformy se navzájem liší v jejich prahové teplotě (27 °C u dTRPA1-A a 34 °C u dTRPA1-D) v důsledku odlišností na N-konci, kde se nachází další oblast modulující tepelnou aktivaci [35]. Naopak druhé dvě isoformy, dTRPA1-B a dTRPA1-C s příslušnou částí na C-konci kódovanou jiným exonem, nevykazovaly v rozmezí 20-42 °C žádné známky tepelné aktivace. Všechny čtyři isoformy však byly citlivé na chemický podnět (AITC) [45].

Aplikací roztoků AITC, N-methylmaleinimidu, Cin a akroleinu na oocyty drápatky vodní (*Xenopus laevis*) se zvýšenou expresí divokého typu dTRPA1 bylo dosaženo výrazných proudových odpovědí, které byly blokovány přidáním rutheniové červeně, neselektivního nekompetitivního inhibitoru TRPA1 kanálů [38]. Při perorálním požití aktivátorů byl u experimentálních jedinců octomilky inhibován reflex, kterým se při kontaktu s potravou rozšíří sosák, čímž se potvrdila citlivost dTRPA1 na tyto substance. Podobných výsledků bylo dosaženo kofeinem [38]. Aktivace dTRPA1 mentholem nebo chladem nebyla v tomto experimentálním modelu pozorována [34, 45].

Kromě TRPA1 má octomilka další receptory z TRPA podrodiny. Jeden z nich je označován jako „Painless“, který postrádá většinu reaktivních cysteinových zbytků [38]. Tento TRPA receptor proto není aktivován elektrofilními látkami, ale hlavně teplem. Navíc jedna z isoform „Painless“ receptoru se podílí na mechanotransdukci v nociceptivních nervových drahách [46].

1.4.2 Lidský TRPA1

Lidský TRPA1 nevykazuje proudové odpovědi při změně teploty v rozmezí 15-42 °C [35], jeho citlivost na chladové podněty není zcela jednoznačně prokázána. Například snížením teploty z 25 °C na 12 °C byl pozorován posun membránového potenciálu, potřebného k poloviční aktivaci TRPA1 kanálu k negativním hodnotám napětí, což vedlo k aktivaci kanálu a toku iontů dovnitř buňky [47]. V jiné studii nebyly proudové odezvy lidského orthologu při aplikaci teplotních skoků zaznamenány [35]. Měřením proudu v uspořádání *single channel* bylo zjištěno, že chlad snižoval bazální aktivitu a vodivost hTRPA1 kanálů [8].

Hlavními aktivátory hTRPA1 jsou látky elektrofilní povahy. Poloviční účinná koncentrace (EC_{50}), potřebná k aktivaci hTRPA1 AITC a Cin, je řádově v desítkách μM [13]. Účinek těchto látek odeznívá i několik minut a je modulován intracelulárními Ca^{2+} ionty. Kofein působí jako inhibitor hTRPA1, snižuje proudové odpovědi kanálů na elektrofilní činidla a napěťové skoky [13, 33]. Lidský TRPA1 je také aktivován mentholem [8, 13] a řadou dalších látek neelektrofilní povahy [48, 49].

1.5 Vliv depolarizace membránového potenciálu na aktivaci TRPA1

Za fyziologických podmínek, kdy je klidový membránový potenciál zpravidla záporný, je TRPA1 jen částečně aktivován chemickými látkami, teplem nebo chladem. Při kladných membránových potenciálech (depolarizace) je jeho aktivita výrazně zvýšena a na membránovém potenciálu vyšším než +100 mV je TRPA1 kanál aktivován i bez přítomnosti chemických aktivátorů [17, 25]. Způsob, jakým probíhá převod depolarizujícího napětí na vrátkování kanálu, není dosud zcela objasněn. Na C-konci hTRPA1 byl identifikován aminokyselinový zbytek Lys969, jehož náhradou za záporně nabitý glutamát došlo při depolarizujících membránových potenciálech vyšších než +140 mV ke snížení proudových odpovědí, a to nezávisle na koncentraci Ca^{2+} iontů [30]. Proudově napěťová charakteristika byla u myšského orthologu TRPA1 výrazně změněna mutací Lys906 v pórovém helixu [50].

Ve studii, která byla primárně věnována hledání oblasti zodpovědné za citlivost savčích TRPA1 orthologů vůči mentholu, byl použit chimérický konstrukt, ve kterém byl u hTRPA1 nahrazen TM5 segment homologní částí dTRPA1 (chiméra hTRPA1-dTM5) (obr. 4 na str. 19) [34]. Tato chiméra byla vystavena 100ms napěťovým skokům

od -50 mV do +200 mV. Proudové odpovědi této chiméry na depolarizační potenciál +180 mV a 100 μ M AITC byly oproti hTRPA1 sníženy. Zajímavé je, že při vysokých kladných potenciálech (+175 mV a +200 mV) byl pozorován pokles amplitudy vně směřujícího membránového proudu [34], což bylo interpretováno jako projev napěťově závislé inaktivace kanálu. Autoři se tímto zajímavým nálezem dále nezabývali, protože bezprostředně nesouvisel s tématem jejich studie. Vzhledem k tomu, že jsme se v našich experimentech zaměřili na molekulární mechanismus napěťové aktivace hTRPA1, rozhodli jsme se navázat na uvedenou studii a prozkoumat napěťové charakteristiky chiméry hTRPA1-dTM5. Dále jsme pomocí elektrofyziologické metody *patch-clamp* chtěli zjistit, zda TM5 doména je důležitá pro aktivaci hTRPA1 depolarizujícím napětím, zda může představovat část napěťového senzoru, nebo zda jde o důležitou doménu, která převádí podněty různých modalit na vrátkování iontového kanálu.



Obr. 4: Porovnání aminokyselinových sekvencí části pórové oblasti TRPA1 receptorů: lidského (hTRPA1), TRPA1 octomilky obecné (dTRPA1) a chiméry hTRPA1-dTM5. U chiméry byla zaměněna 5. transmembránová doména (TM5) hTRPA1 za homologní část dTRPA1.

2. Cíle práce

Předložená bakalářská práce má za cíl porovnat funkční vlastnosti TRPA1 receptoru u různých živočišných druhů a charakterizovat jeden z důležitých funkčních aspektů – aktivaci TRPA1 depolarizačním membránovým napětím.

Práce si klade za cíl:

1. Připravit dostatečné množství cDNA expresního plasmidu s insertem chiméry lidského TRPA1 receptoru a jeho ověření.
2. Připravit transfekované tkáňové kultury HEK 293T s pozitivní expresí lidského nebo chimérického proteinu TRPA1 receptoru.
3. Pomocí techniky *patch-clamp* v konfiguraci *whole-cell* popsat a vzájemně porovnat hlavní aktivační a deaktivující charakteristiky lidského orthologu TRPA1 a chimérického konstruktů.
4. Pokusit se uvést nové výsledky získané v experimentální části do souvislosti se současnými představami o aktivačním a deaktivčním (tj. vrátkovacím) mechanismu TRPA1 iontového kanálu se zaměřením na mezidruhové rozdíly.

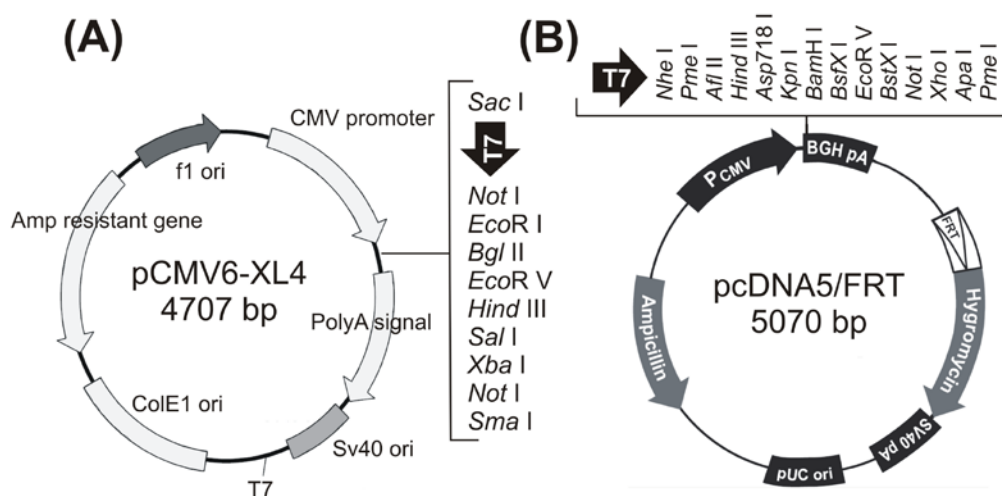
3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie

- **Sigma-Aldrich, USA:** NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, glukosa, CsCl, NaOH, Na₂HPO₄, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová (HEPES), CsOH (99% roztok), KH₂PO₄, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA), adenosintrifosfát hořečnatý (MgATP), poly-L-lysin, Trizma base, ampicilin
- **Life Technologies, USA:** OPTI-MEM I médium
- **Geneaid Biotech, USA:** High Speed Plasmid Mini Kit
- **IBA GmbH, SRN:** transfekční činidlo „Magnet-assisted Transfection (MATra)“
- **SERVA Electrophoresis GmbH, SRN:** pepton z kaseinu, extrakt z kvasinek (yeast extract)
- **Invitrogen, USA:** trypsin
- **Biolife, IT:** Živný agar N°2

3.2 Biologický materiál

- lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (HEK 293T) (LGC Standards, VB)
- cDNA hTRPA1 ve vektoru pCMV6-XL4 (OriGene, USA) (obr. 5)
- cDNA chiméry hTRPA1 s S5 doménou octomilky obecné ve vektoru pcDNA5/FRT (poskytnuto prof. Ardemem Patapoutianem, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) (obr. 5)



Obr. 5: Mapa vektoru pCMV6-XL4 (A) a pcDNA5/FRT (B) (převzato a upraveno podle [51-53]).

- plasmid pro zelený fluorescenční protein ve vektoru pQBI 25 (dále jen GFP) (TaKaRa)
- fetální bovinní sérum (FBS, PAN Biotech GmbH)
- kompetentní bakteriální buňky XL10-Gold kmene *E. coli* (Agilent Technologies, USA)

3.3 Přístroje a pomůcky

- Zesilovač *Axopatch-1D* (Axon Instruments)
- Invertovaný mikroskop *CKX41* (Olympus)
- Mikromanipulátor *MP-225* (Sutter Instrument)
- Horizontální tahač elektrod *P-1000* (Sutter Instruments Co.)
- Microforge *MF-830* (Narishige)
- Laminární box *VBH C2 (Steril)* (Schoeller Instruments)
- Inkubátor *MCO-36AIC* (Sanyo)
- Autokláv *Sanyo MAC 235EX* (Sanyo)
- Osmometr *Vapro* (Wescor)
- pH metr *3510 pH Meter* (Jenway)
- Magnetická míchačka *1100 Hotplate & Stirrer* (Jenway)
- Centrifuga *Rotilabo-mini centrifuge* (Carl Roth GmbH)
- Centrifuga *Mikro 120* (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga *Rotanta 460R* (Hettich Zentrifugen)
- Spektrofotometr *NanoDrop 1000* (NanoDrop Technologies)
- DNA sekvenátor *ABI 3730xl* (Applied Biosystems)
- Rotační inkubátor *Shaking Incubator NB-205* (N-Biotek)
- Vortex *MS 2 Minishaker* (IKA)
- Automatické pipety (Gilson, Nichipet EX)

3.4 Roztoky

Extracelulární roztok obsahoval 160mM NaCl, 2,5mM KCl, 1mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 10mM HEPES a 10mM glukosu. pH bylo upravováno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,3. Osmolalita extracelulárního roztoku byla 320 mmol·kg⁻¹.

Pro plnění elektrod byl použit intracelulární roztok, který obsahoval 145mM CsCl, 5mM EGTA, 10mM HEPES, 3mM CaCl₂ a 2mM MgATP. pH bylo upravováno pomocí CsOH na hodnotu 7,3. Osmolalita intracelulárního roztoku byla 290 mmol·kg⁻¹.

Fosfátový pufr (PBS) obsahoval 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,47mM KH₂PO₄ a 4,3mM Na₂HPO₄. pH bylo upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,3.

Versenův roztok obsahoval roztok fosfátového pufru PBS, 0,68mM EDTA a 87μM trypsin (pH 7,3).

Pro pěstování kompetentních bakterií bylo použito kultivační médium (anglicky „Lysogeny Broth medium“, dále LB médium), obsahující 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) extrakt z kvasinek a 0,26MNaCl. Složky média byly rozpuštěny v deionizované vodě a směs byla sterilizována při 121°C.

3.5 Transformace XL10-Gold ultrakompetentních buněk kmene *E. coli* metodou teplotního šoku

Kit pro transformaci, sestávající z XL10-Gold ultrakompetentních buněk a β-merkptoethanolu, byl uchováván při -85°C v mrazicím boxu, pro transformaci byly obě složky rozmrazeny na ledu. Do předchlazené mikrozkušavky bylo napipetováno 30 μl buněk a přidáno 2 μl β-merkptoethanolu. Směs byla za občasného míchání inkubována po dobu 10 minut. Poté byl do směsi přidán 1 μl plasmidu chiméry hTRPA1 s TM5 doménou octomilky obecné (koncentrace 700 ng·μl⁻¹), směs byla promíchána a pak inkubována na ledu po dobu 30 minut.

Po uplynutí 30 minut byla mikrozkušavka ponořena na 45 s do vodní lázně, předehřáté na 42°C, poté byla opět inkubována 2 minuty na ledu. Ke směsi bylo přidáno 200 μl LB média předehřátého na 42°C a následující 1 hodinu se směs inkubovala při 37°C za stálého míchání (rotační inkubátor *Shaking Incubator NB-205*, 230 RPM, 25°C). Obsah zkumavky byl asepticky vyset na agarovou plotnu (koncentrace použitého živného agaru N°2 byla 40 g·l⁻¹) s ampicilinem o finální koncentraci 71,5 μM. Plotna byla umístěna v zavěšené poloze do inkubátoru (37°C, 5% CO₂) po dobu 16 hodin.

Po inkubaci byla sterilní špičkou odebrána samostatná bakteriální kolonie a přemístěna do zkumavky s 6 ml LB média a ampicilinem o koncentraci 14,3 μM. Zkumavky byly 16 hodin inkubovány (rotační inkubátor *Shaking Incubator NB-205*, 230 otáček za minutu (RPM), 37°C). Po inkubaci byl obsah zkumavek centrifugován (centrifuga *Rotanta 460R*, 4°C, 6000 x g, 7 min), supernatant byl odstraněn a z pelety byla izolována plasmidová DNA (viz kapitola 3.6).

3.6 Izolace plasmidové DNA a následné ověření sekvenací

Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí komerčně dodaného kitu „High Speed Plasmid Mini Kit“. Centrifugace ve všech krocích izolace probíhala za stejných podmínek (centrifuga *Mikro 120*, 16 000 x g, 25 °C). Bakteriální peleta byla resuspendována 200 µl pufru PD1 a přenesena do mikrozkuhavky. Bylo přidáno 200 µl PD2 pufru, směs byla 10x promíchána překlopením a následně byla v klidu inkubována po dobu 2 minut. Po přidání 300 µl pufru PD3 se směs míchala 10x pomalým otáčením. Vzniklá sraženina byla odstředěna centrifugací po dobu 3 minut. Supernatant byl opatrně přemístěn na kolonku a 60 s centrifugován. Filtrát byl odstraněn a kolona byla promyta 400 µl W1 pufrem. Po 60s centrifugaci a odstranění supernatantu byla kolona znovu promyta 600 µl promývacím pufrem a 60 s odstředována. Samotná kolonka byla ještě 3 minuty centrifugována, poté byla umístěna do čisté mikrozkuhavky a bylo aplikováno 50 µl elučního pufru. Pufř působil 2 minuty a následně byla DNA eluována z kolonky centrifugací po dobu 2 minut.

Koncentrace DNA ve vzorcích byla stanovena měřením absorbance pomocí spektrofotometru *NanoDrop 1000* při vlnové délce 260 nm. Výsledný produkt izolace plasmidu byl ověřen DNA sekvenováním, které provedla firma Biogen Praha s.r.o..

3.7 Tkáňové kultury a transfekce

Lidské embryonální buňky linie 293T (HEK 293T) byly kultivovány v médiu OPTI-MEM s 5% fetálním bovinním sérem (FBS) na miskách pokrytých poly-L-lyzinem s hustotou přibližně 180 000 buněk·cm⁻². HEK 293T buňky byly přechodně transfekovány rekombinantní cDNA lidského TRPA1 receptoru ve vektoru pCMV6-XL4 nebo cDNA chiméry ve vektoru pcDNA5/FRT o koncentraci 400 ng na misku za použití transfekční reagentie MATra (0,1 µl na 100 ng DNA). Pro identifikaci pozitivně transfekovaných buněk při elektrofyziologických měřeních byly buňky současně transfekovány zeleným fluorescenčním proteinem ve vektoru pQBI 25 o koncentraci 300 ng na misku. Ke směsi bylo přidáno 50 µl roztoku OPTI-MEM a směs byla vortexována. Po 20 minutové inkubaci byla transfekční směs aplikována na buňky, které byly poté na 15 minut umístěny na permanentní magnet do inkubačního boxu (5% CO₂, 37 °C). Pro pasážování transfekovaných buněk byly použity roztoky PBS a Versenův roztok obsahující trypsin. Po pasážování byly buňky rozmístěny na sklíčka

pokrytá poly-L-lysinem (dvě až tři sklíčka o průměru 12 mm na miskách o průměru 35 mm).

3.8 Elektrofyziologická technika *patch-clamp*

Patch-clamp (v překladu do češtiny „terčíkový zámek“) je elektrofyziologickou technikou, při níž jsou snímány proudy iontů z jednotlivých buněk, přičemž je membránový potenciál udržován na konstantní hodnotě, případně ho lze skokově nebo kontinuálně měnit. Je také naopak možné měnit proudy a měřit související změny napětí. Vybavení pro metodu *patch-clamp* se skládá z invertovaného mikroskopu, vybaveného fluorescenční lampou, mikromanipulátoru, zesilovače, analogově-digitálního převodníku a počítače (obr. 6 na str. 26).

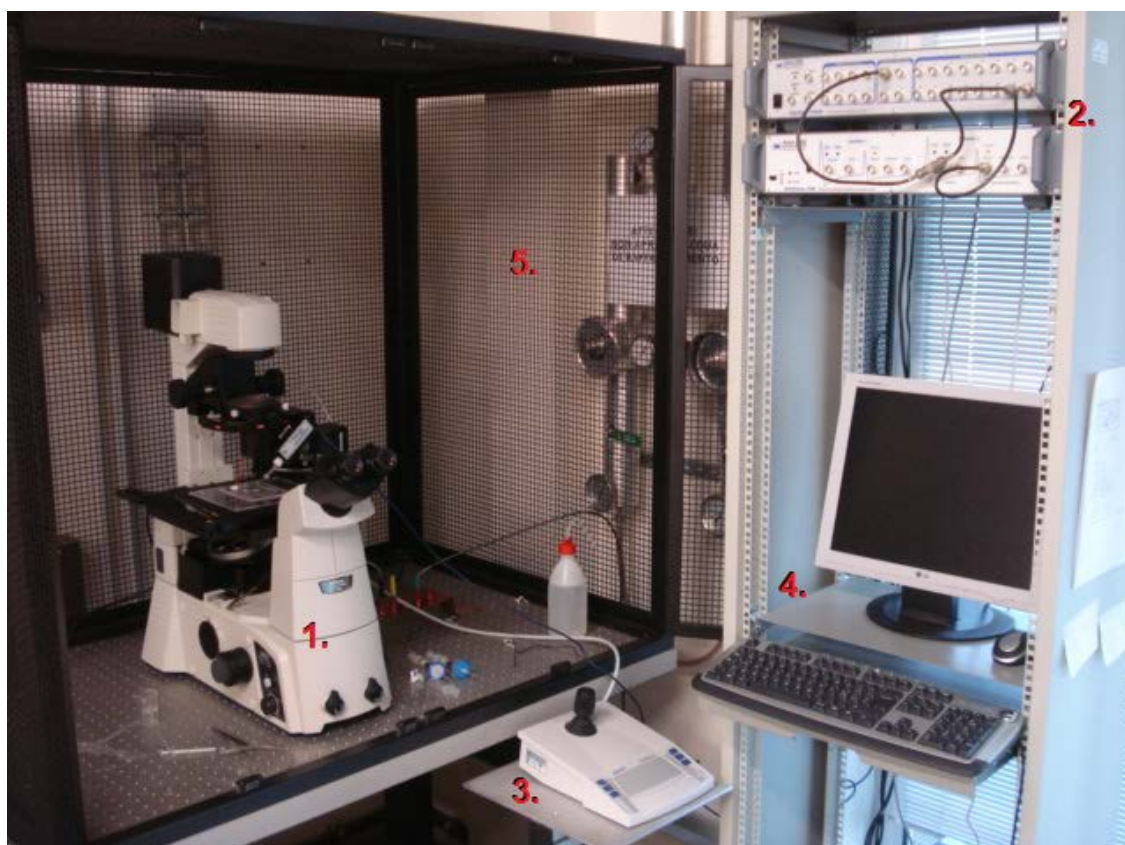
Pro měření elektrických odpovědí buněk metodou *patch-clamp* se používají dvě elektrody – referentní, která je ponořena do roztoku s buňkami, a stříbrná elektroda pokrytá vrstvou AgCl umístěná ve skleněné trubičce (mikropipeta), která má konec vytažený do velice úzkého hrotu a je naplněna vodivým roztokem. Odpor elektrody odráží šířku jejího ústí. Pro elektrofyziologická měření eukaryotických buněk postačí elektrody o odporu v rozmezí 3-6 M Ω .

Proudové odpovědi je podle typu experimentu možné měřit v několika uspořádáních. Prvním z nich je přichycení ústí skleněné mikroelektrody k membráně buňky, čímž se vytvoří vysoký (v řádech G Ω) elektrický odpor (uspořádání *cell-attached*). Takto lze získat informace o proudových charakteristikách jednoho nebo několika iontových kanálů. Jiný typ informace lze získat, pokud se přichycená část membrány vytrhne z buňky a do vnějšího roztoku bude směřovat vnitřní (uspořádání *inside-out*), nebo vnější strana plasmatické membrány (uspořádání *outside-out*). Při uspořádání *whole-cell* záznamu dojde k protržení přichyceného „terčíku“ membrány a výměně vnitrobuněčného obsahu za experimentální roztok, kterým je naplněna skleněná mikropipeta. Snímané proudy jsou v tomto uspořádání souhrnnou odezvou všech buněčných iontových kanálů přítomných na buněčné membráně.

V našem experimentálním uspořádání byly elektrické proudy snímány z povrchu celých buněk (konfigurace *whole-cell*), obvykle 24 až 48 h po transfekci. Pro pokusy s napětově řízenou stimulací bylo ze dvou transfekcí studováno nejvýše pět GFP pozitivních buněk na každém sklíčku. Elektrické proudy byly měřeny pomocí referenční argentschloridové elektrody, ponořené do roztoku, a měřicí stříbrné elektrody, která byla

pokrytá vrstvou AgCl. Měřicí elektroda byla umístěna ve skleněné mikropipetě vyrobené z borosilikátového skla (vnější průměr 1,65 mm) s vytaženým hrotem. Mikropipeta byla naplněna intracelulárním roztokem (viz Metody 3.4). Pomocí mikromanipulátoru MP-225 byla elektroda navedena těsně nad měřenou buňku. Aplikací podtlaku ústy přes gumovou hadičku připojenou k ústí mikroelektrody se vytvořilo spojení, které poskytuje odpor přibližně v řádu G Ω . Další aplikací podtlaku byla buněčná membrána protřena, čímž došlo k propojení vodivého roztoku v elektrodě s cytoplasmou.

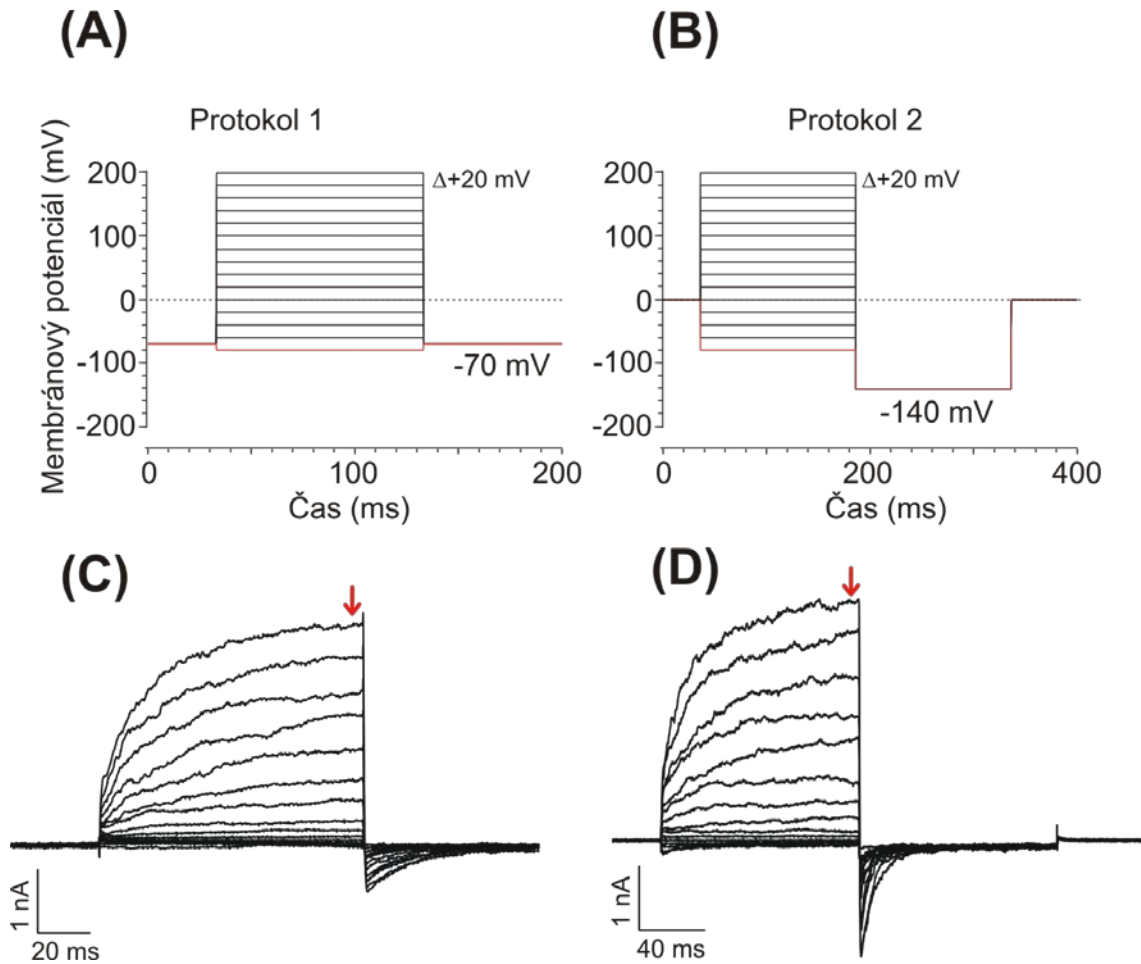
Na buňku byly aplikovány napěťové skoky definované dvěma různými protokoly, při kterých se měnilo napětí mezi elektrodami. Proudové odpovědi byly snímány zesilovačem *Axopatch 1-D* použitím programu pCLAMP10 (Molecular Devices, USA). Sériový odpor byl obvykle menší než 10 M Ω a nebyl kompenzován. Teplota v místnosti byla mezi 22-25 °C.



Obr. 6: Uspořádání technického vybavení pro výzkum funkce iontových kanálů metodou patch-clamp. Na obrázku jsou vidět potřebné součásti: invertovaný mikroskop (1), zesilovač a analogově-digitální převodník (2), mikromanipulátor (3), počítač (4). Aparatura se nachází ve Faradayově kleci (5) pro potlačení nežádoucího elektrického rušení z okolí.

3.9 Aktivace TRPA1 depolarizačním napětím

Aktivace TRPA1 iontových kanálů depolarizačním napětím byla měřena pomocí dvou různých protokolů v programu Clampex 10. Prvním protokolem byly buňky udržovány na membránovém potenciálu -70 mV a každých 200 ms byl opakovaně generován aktivační napěťový skok s postupně se zvyšující hodnotou membránového potenciálu od -80 mV do $+200$ mV po $+20$ mV, trvající 100 ms (obr. 7.A).



Obr. 7: Schéma stimulačních protokolů používaných pro stanovení napěťové aktivace přirozené a chimérické formy TRPA1 kanálů – protokol 1 (A) a protokol 2 (B). Časový průběh změn membránového potenciálu byl naprogramován v prostředí programu Clampex 10. Červeně je vyznačen časový průběh první stimulace, černě jsou označeny následující stimulace, lišící se od předchozí zvýšením aktivačního potenciálu o $+20$ mV. Celkem jsou oba protokoly složeny z 15-ti na sebe navazujících stimulací. Aplikací protokolu 1 (C) a protokolu 2 (D) na transfekované buňky se získají záznamy membránového proudu (proudové odpovědi) v závislosti na aplikovaném napětí. Červená šipka označuje oblast, ve které byla pro jednotlivé stimulace odečtena maximální amplituda membránového proudu.

Při použití druhého protokolu byly buňky udržovány na membránovém potenciálu 0 mV a opakovaně, s intervaly 400 ms, byla po dobu 150 ms generována aktivační skoková změna napětí s postupně se zvyšující hodnotou od -80 mV do + 200 mV po +20 mV, následovaná deaktivací skokovou změnou potenciálu na -140 mV trvající 150 ms (obr. 7. B na str. 27). Membránové proudy byly filtrovány na 2 kHz dolnoproputním (4-pólovým interním Besselovým) filtrem a zaznamenávány vzorkovací frekvencí 10 kHz.

3.10 Hodnocení záznamů a statistická analýza

Naměřená data byla analyzována programem Clampfit 10.2 (Molecular Devices), pro statistické vyhodnocení a tvorbu grafů byl použit program SigmaPlot 10.0 (Systat Software).

Hodnoty průměrné amplitudy membránového proudu (I) byly odečteny vždy na konci pulzu, kdy byla aktivační fáze odpovědi blízka rovnovážnému stavu (95-99 ms u protokolu 1 (obr. 7.C na str. 27) a 145-149 ms u protokolu 2 (obr. 7.D na str. 27), a zobrazeny v závislosti na příslušném membránovém potenciálu (I/V závislost). Obě závislosti mají synonymní význam, v literatuře se používají obě varianty. Pro každý záznam pořízený daným protokolem byl v programu Clampfit 10.2 odhadnut reverzní membránový potenciál (V_{rev}) proložením 5 bodů I/V závislosti v okolí předpokládaného průsečíku s osou V polynomickou funkcí 4. řádu:

$$f(x) = ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e \quad (1)$$

Výsledná hodnota V_{rev} byla odečtena z grafu. Závislost elektrické vodivosti buňky (G) na napětí (V) byla vypočtena vydělením proudových amplitud (I) příslušnou hodnotou membránového potenciálu, od které byla odečtena hodnota reverzního potenciálu ($V - V_{rev}$). V některých případech byla testována možnost proložení G/V závislosti Boltzmannovou funkcí:

$$G = \frac{G_{max} - G_{min}}{1 + \exp\left(-\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})\right)} + G_{min}, \quad (3)$$

kde G_{max} je maximální dosažitelná vodivost buňky; G_{min} je minimální vodivost; F je Faradayova konstanta ($F = 96\,485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$); V je napětí; $V_{1/2}$ představuje napětí, při kterém vodivost dosahuje poloviční hodnoty svého maxima; R zastupuje univerzální plynovou konstantu ($R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{K}\cdot\text{mol}^{-1}$), z je vrátkovací náboj (překlad anglického

„gating charge“) a T je absolutní teplota [54]. Ze získaných hodnot $V_{1/2}$ byla pro lidský a chimérický TRPA1 byla získána průměrná hodnota a střední chyba průměru.

Protokoly 1 a 2 bylo třeba vzájemně porovnat. Vzhledem k různým charakteristikám měřených buněk bylo vhodné porovnávat proudové odpovědi naměřené použitými protokoly v rámci jedné buňky. Naměřené záznamy také mohly být ovlivněny pořadím aplikovaných protokolů. Proto byly na transfekované buňky aplikovány za sebou oba napěťové protokoly. Dvojice záznamů získaných proudových odpovědí byly rozděleny podle pořadí aplikovaných protokolů do dvou skupin. Skupiny mohly být porovnány na základě relativní amplitudy membránového proudu I_{rel} :

$$I_{rel} = \frac{I_2}{I_1} \quad (2)$$

kde I_1 a I_2 jsou maximální amplitudy membránového proudu, získaného z prvního a druhého záznamu z buňky. Relativní proudy byly statisticky vyhodnoceny pomocí párového t-testu v programu SigmaPlot 10.0. s hladinou významnosti testu $P = 0,05$. Pro uvedené hodnoty byly určeny aritmetické průměry a střední chyby průměru.

Pro zjištění rychlosti aktivace kanálu depolarizačním potenciálem byly proudové odpovědi při maximálním napěťovém skoku na +200 mV s dostatečným odstupem (3-5 ms) od počátku pulzu proloženy součtem exponenciálních funkcí podle vztahu:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} + C \quad (4)$$

kde A_i je podíl i -té exponenciály na celkové funkci, C je hodnota proudu v rovnovážném stavu (hypoteticky pro $t \rightarrow \infty$), τ_i je časová konstanta i -té exponenciální funkce, n je počet exponenciál ($n = 1; 2$).

Obdobným způsobem byly vyhodnoceny deaktivální proudové odpovědi protokolu 2, vyvolané skokem na hyperpolarizující potenciál -140 mV (tzv. „tail“), které charakterizují dynamiku uzavírání kanálu. Naměřené záznamy byly s odstupem 3 ms od počátku napěťového skoku proloženy jednou exponenciálou, popřípadě součtem dvou exponenciálních funkcí. V případě záznamů s vysokým šumem byl použit dolnoproustný digitální Besselův filtr (700 Hz, pokud není uvedeno jinak). Pokud bylo k dispozici více měření dané buňky, byl proložen exponenciální funkcí jejich průměrný záznam.

Ze získaných časových konstant τ_1 a τ_2 byly vypočítány jejich vážené průměry - $\tau_w(on)$ pro aktivaci a $\tau_w(off)$ pro deaktivaci - podle vztahu:

$$\tau_w = \frac{A_1}{A_1+A_2} \tau_1 + \frac{A_2}{A_1+A_2} \tau_2 \quad (5)$$

V případě prokládání proudové odpovědi součtem dvou exponenciálních funkcí jsou A_1 a A_2 příspěvky exponenciál k výsledné regresní funkci, pro záznamy proložené jednou exponenciálou je $A_2 = 0$. Vážené průměry časových konstant byly statisticky vyhodnoceny pomocí párového t-testu, případně pomocí Mann-Whitneyho testu, v programu SigmaPlot 10.0 s hladinou významnosti testu $P = 0,05$. Pro uvedené hodnoty byly určeny aritmetické průměry a střední chyby průměru.

4. Výsledky

4.1 Amplifikace plasmidu hTRPA1-dTM5 v buňkách *E. coli*

Plasmid nesoucí hTRPA1-dTM5 byl metodou teplotního šoku transformován do bakteriálního systému *E. coli*. V plasmidu se nacházel gen zajišťující resistenci vůči ampicilinu, který byl použit pro selekci pozitivně transformovaných buněk. Následnou kultivací bakterií na agarové plotně s ampicilinem narostly jednotlivé kolonie úspěšně transformovaných bakterií.

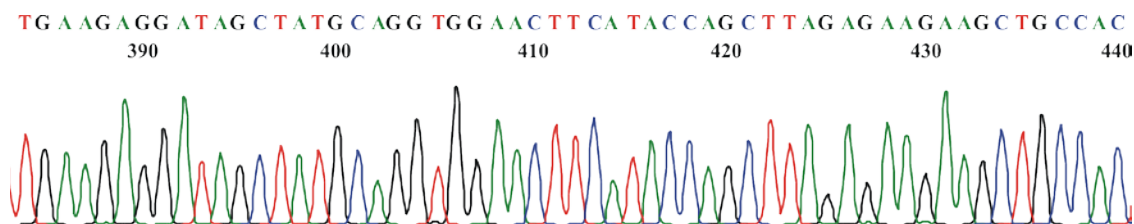
Pro izolaci plasmidu z bakterií byla vybrána samostatná kolonie, která byla kultivována v LB médiu. Po kultivaci byla izolována plasmidová DNA pomocí kitu „High Speed Plasmid Mini Kit“. Absorbance izolované DNA byla změřena spektrofotometrem *NanoDrop 1000* při vlnové délce 260 nm, z naměřených dat byla pomocí programu od stejného výrobce spočítána koncentrace cDNA v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ podle Beerova zákona:

$$c = \frac{A \cdot e}{b}, \quad (6)$$

kde c je molalita v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, A je absorbance, e je extinkční koeficient v $\text{ng}\cdot\text{cm}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (pro dsDNA je $e = 50 \text{ ng}\cdot\text{cm}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a b optická dráha v cm. Celkem bylo získáno 100 μl roztoku DNA o koncentraci $154 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Správnost insertu cDNA v plasmidu byla ověřena sekvenací (obr. 8). V sekvenci převládá jediná DNA, což je známkou vysoké čistoty plasmidu.

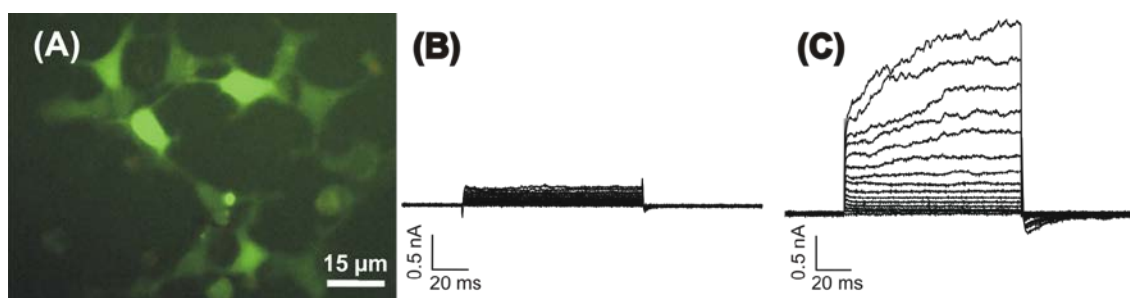
4.2 Transfekce buněk HEK 293T

Plasmidy kódující TRPA1 receptory byly transfekovány do HEK 293T buněk pomocí částic MATra a permanentního magnetu. Buňky byly současně transfekovány plasmidem pro GFP pro vizuální identifikaci buněk s vysokou pravděpodobností exprese TRPA1 receptoru (obr. 9.A na str. 32). Většina buněk s pozitivním nálezem GFP vykazovala funkční expresi TRPA1 iontových kanálů.



Obr. 8: Část výsledku sekvenace izolovaného plasmidu pro expresi hTRPA1-TM5.

Expres TRPA1 byla ověřena při elektrofyziologickém měření technikou *patch-clamp*. Proudové odpovědi netransfekovaných buněk vykazovaly lineární závislost na aplikovaném membránovém potenciálu a dosahovaly odpovědi nejvýše kolem 500 pA (obr. 9.B). Naproti tomu buňky s expresí TRPA1 měly proudové odpovědi mnohonásobně vyšší (v průměru 3500 pA při +200 mV) a měly charakteristický tvar proudově-napěťové závislosti (obr. 9.C).



Obr. 9: (A) Transfekované HEK 293T buňky s expresí GFP (převzato a upraveno podle [55]). (B) Proudová odpověď netransfekované buňky, změřená metodou *patch-clamp* v uspořádání *whole-cell*. (C) Proudová odpověď transfekované buňky *hTRPA1* plasmidem, změřená metodou *patch-clamp* v uspořádání *whole-cell*. V obou případech byl aplikován protokol 1.

4.3 Proudově-napěťová charakteristika hTRPA1 - porovnání napěťových protokolů

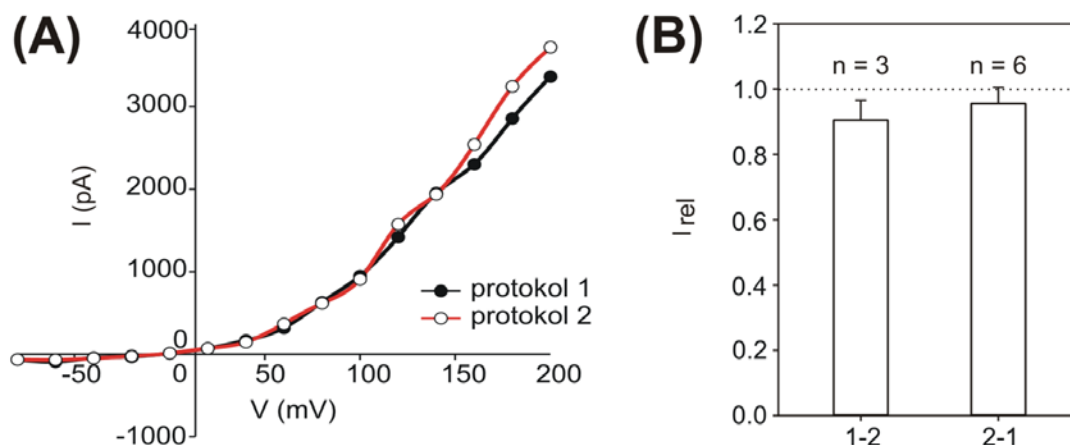
Pro získání proudově-napěťové charakteristiky byly použity dva různé protokoly (Protokol 1 a Protokol 2, viz sekce 3. Metody), kterými byla stimulována buňka bezprostředně po vytvoření *whole-cell* konfigurace a kompenzací rychlé a pomalé komponenty kapacitního odporu.

Protokol 1 zajišťoval minimalizaci intervalu depolarizačního pulzu a nižší intenzitu následné hyperpolarizace. V našich měřeních bylo skutečně pozorováno, že oproti protokolu 2 nedochází k nežádoucímu zhoršení odporu nezbytného pro kvalitní snímání. Chimérický konstrukt však vykazoval podstatně nižší proudové odpovědi a nedosahoval během 100ms pulzu rovnovážného stavu.

Při použití protokolu 2 dosahovala proudová odpověď v aktivační fázi rovnovážného stavu u *hTRPA1*. V případě chiméry bylo zjištěno, že delší doba depolarizace je nutná pro dosažení rovnovážného stavu aktivace i při její nižší proudové odpovědi. V důsledku silné hyperpolarizace cytoplasmatické membrány (-140 mV) však

byla zvýšená pravděpodobnost zhoršení měřících parametrů terčiku –měřené buňky měly tendenci uvolnit těsné spojení s mikroelektrodou a znemožnit tak elektrické snímání.

Pro měření chimér poskytoval protokol 2 optimální parametry, proto byl používán ke stanovení aktivačních a deaktivčních charakteristik obou typů TRPA1 kanálů. Bylo nezbytné ověřit, zda použitím protokolu 2 získáme výsledky srovnatelné s experimenty dříve provedenými v naší laboratoři. Porovnáním proudových odpovědí, naměřených protokoly 1 a 2 (obr. 10.A) bylo zjištěno, že maximální amplitudy membránového proudu se u divokého typu statisticky neliší ($P < 0,05$), že nezáleží na pořadí aplikace těchto dvou protokolů, a že proudové odpovědi na +200 mV dosahují v obou případech aktivační rovnováhy. Relativní amplituda činila $0,90 \pm 0,06$ ($n = 6$) pro záznamy s protokolem 1 jako prvním, zatímco pro záznamy s opačným pořadím protokolů byla relativní amplituda $0,95 \pm 0,05$ ($n = 3$). (obr. 10.B)

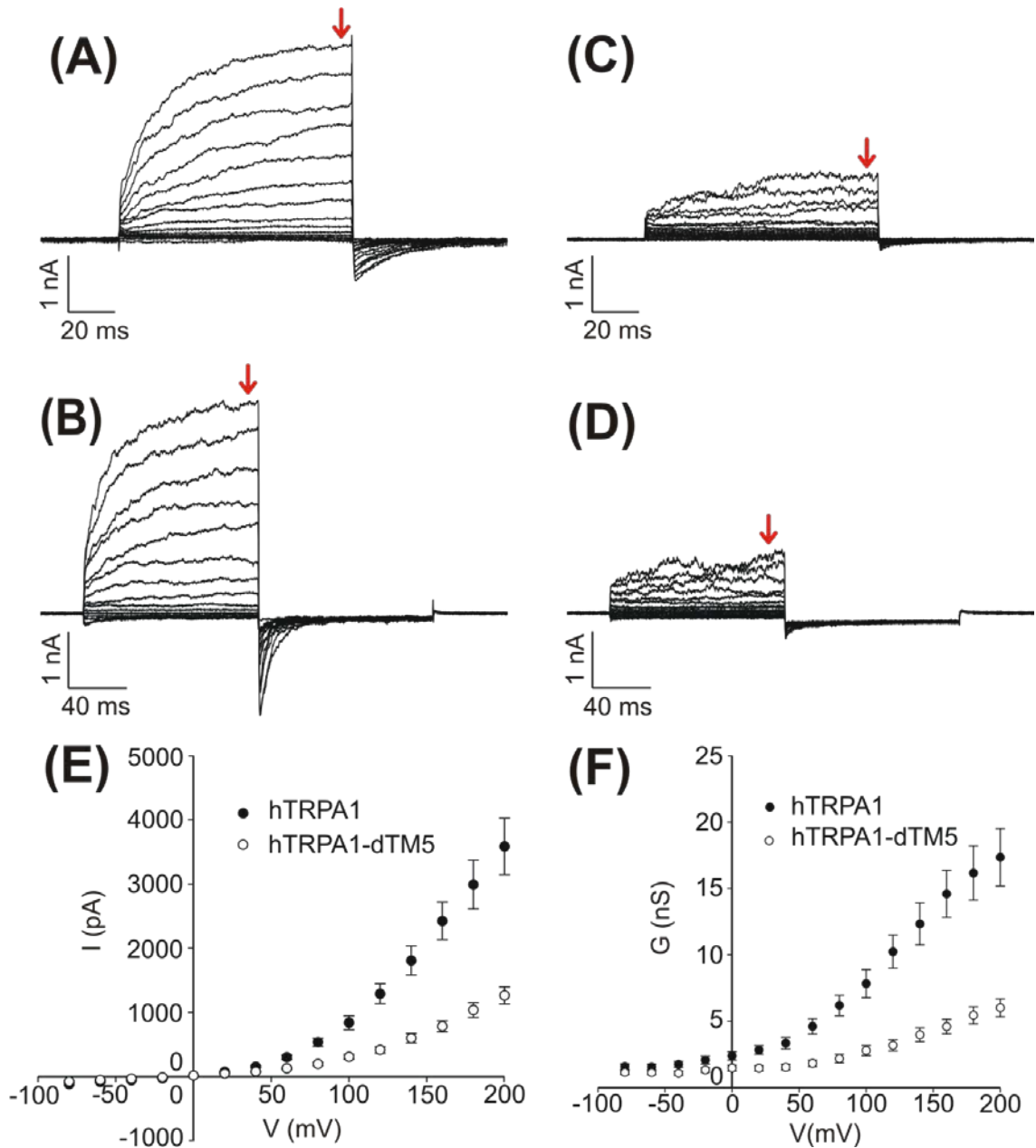


Obr. 10: Porovnání napěťových protokolů 1 a 2. (A) Charakteristická závislost amplitudy membránového proudu hTRPA1 na membránovém potenciálu (I/V závislost) pro protokol 1 a 2. (B) Relativní amplitudy membránového proudu pro dvojice měření, ve kterých byly po sobě použity různé protokoly. Relativní amplituda je podílem maximálních proudových odpovědí prvního a následujícího měření při +200 mV. Popisky sloupců udávají pořadí aplikovaných protokolů.

4.4 Aktivace chiméry hTRPA1-dTM5 depolarizujícím napětím

Dále byla zkoumána závislost proudových odpovědí hTRPA1 a hTRPA1-dTM5 kanálů na membránovém potenciálu (I/V závislost). Z proudových odpovědí hTRPA1 (obr. 11.A-B na str. 34) a chiméry hTRPA1-dTM5 (obr. 11.C-D na str. 34) byly na konci pulzu odečteny průměrné proudy, z nichž byly sestrojeny I/V závislosti (obr. 11.E na str. 34). Až do membránového potenciálu +40 mV se od sebe proudové odpovědi lidského

a chimérického TRPA1 nelišily, při vyšším depolarizačním napětí dosahovaly proudy lidského TRPA1 více než dvakrát vyšší hodnoty.

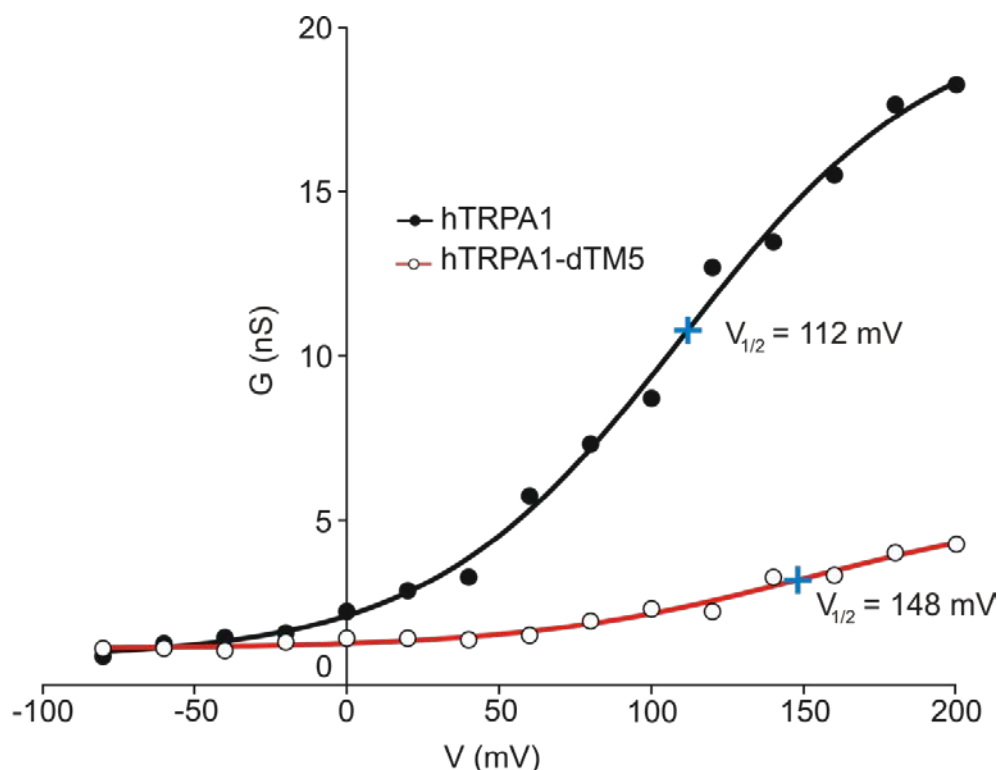


Obr. 11: Napěťová charakteristika hTRPA1 a hTRPA1-dTM5. Z proudových odpovědí lidského TRPA1 na protokol 1 (A) a protokol 2 (B), a z odpovědí chiméry – protokol 1 (C) a protokol 2 (D) byly odečteny na konci napěťového pulzu (95-99 ms u protokolu 1, 144-149 ms u protokolu 2), průměrné amplitudy membránového proudu. Oblasti pro odečtení proudů jsou znázorněny červenou šipkou. (E) Graf závislosti membránového proudu na membránovém potenciálu pro hTRPA1 (černě, $n = 15$) a hTRPA1-dTM5 (červeně, $n = 17$). (F) Závislost vodivosti G na membránovém potenciálu pro hTRPA1 (černé symboly, $n = 15$) a hTRPA1-dTM5 (prázdné symboly, $n = 17$).

Přepočítáním proudů (I) na vodivost (G) se ukázalo, že maximální vodivost chiméry je oproti lidskému orthologu asi pětkrát nižší (obr. 11.F na str. 34). Při kladných hodnotách napětí rostla vodivost chiméry lineárně, u hTRPA1 došlo mezi + 100 mV a +150 mV ke zpomalení růstu vodivosti, což nasvědčuje přiblížení se ke stavu plné aktivace. Poloviční aktivační napětí je u chiméry posunuto doprava. Oba kanály nedosáhly v rozsahu měření maximální vodivosti, při vysokých kladných potenciálech bylo zaznamenáno pouze zpomalení růstu vodivosti.

4.5 Porovnání aktivačních parametrů konstruktů

Pro stanovení napětí $V_{1/2}$, při kterém dosahuje vodivost buňky poloviční hodnoty maxima, byly proloženy vypočítané hodnoty vodivosti Boltzmannovou funkcí (obr. 12). Proložení se numericky zdařilo u 6 z 15 buněk s expresí hTRPA1 a u 5 ze 17 buněk, ve kterých byl exprimován hTRPA1-dTM5. Výsledná hodnota $V_{1/2}$ u chimérického konstruktů byla oproti hTRPA1 vyšší ($V_{1/2} = 148,3 \pm 5,8$ mV pro hTRPA1-dTM5; $n = 5$, $V_{1/2} = 112,2 \pm 4,5$ mV pro hTRPA1; $n = 6$; $P < 0,001$).



Obr. 12: Příklad proložení závislosti vodivosti na napětí pro hTRPA1 (černě) a hTRPA1-dTM5 (červeně). Hodnoty vodivosti byly proloženy Boltzmannovou funkcí, z níž bylo odečteno poloviční účinné napětí $V_{1/2}$ (modrý křížek), udávající hodnotu napětí, při které dosahuje vodivost poloviny svého maxima. Poloviční účinné napětí bylo určeno u 6 z 15 buněk s hTRPA1 a u 5 ze 17 buněk s hTRPA1-dTM5.

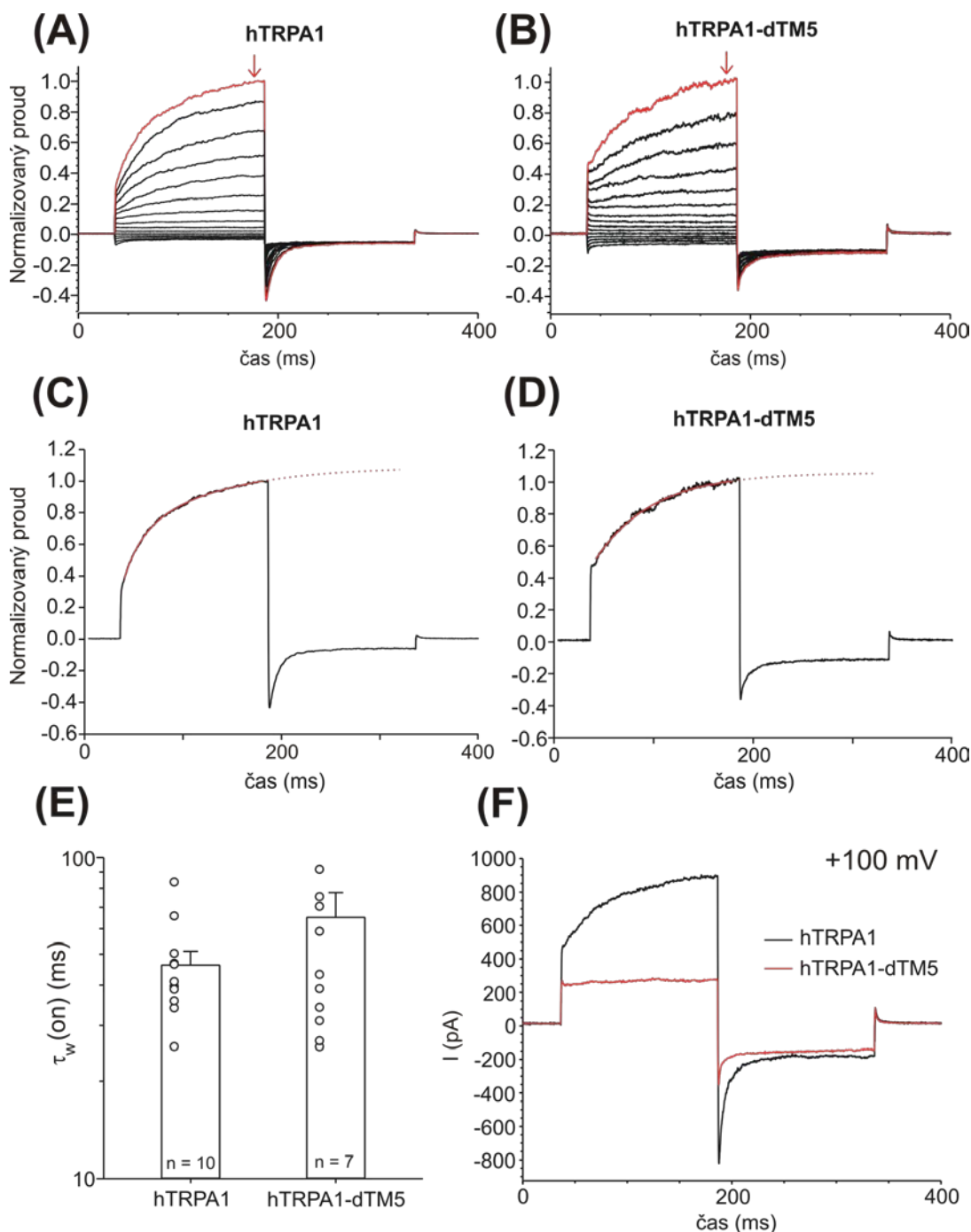
4.6 Vyhodnocení kinetiky aktivace

Aktivační fáze proudových odpovědí TRPA1 při stimulaci depolarizačním napětím je popisována časovou konstantou τ_{on} , udávající průměrnou relaxační dobu, za kterou otevření kanálů dosáhne rovnovážného stavu. Zvyšující se hodnota τ_{on} znamená pomalejší nárůst proudu za jednotku času. K určení časových konstant byl využit napěťový protokol 2, neboť má oproti protokolu 1 déletrvající depolarizující pulz, který umožňuje správnější extrapolaci exponenciální funkcí i v případě delších časových konstant. Aby bylo možné porovnat záznamy z lidského TRPA1 se záznamy z chimérických receptorů, které vykazují podstatně menší proudové odpovědi, byly časové průběhy membránového proudu normalizovány na maximální amplitudu membránového proudu při +200 mV (obr. 13.A-B na str. 37). Při porovnání průměrných záznamů získaných z normalizovaných proudů bylo na první pohled patrné, že u chimérického konstruktu je aktivační fáze pomalejší a deaktivací proudy jsou relativně sníženy oproti divokému typu. Časové konstanty aktivace a deaktivace byly proto dále zjišťovány pro záznamy z jednotlivých buněk.

Časové konstanty byly získány ze záznamu při +200mV napěťovém skoku proložením exponenciálními funkcemi (obr. 13.C-D na str. 37). Vážený průměr časových konstant byl u hTRPA1-dTM5 vyšší, než u hTRPA1 ($\tau_w(on) = 65 \pm 12$ ms, $n = 7$ oproti $46,1 \pm 4,8$ ms, $n = 10$), z důvodu velkého rozptylu dat však nebylo významné zvýšení časové konstanty potvrzeno ($P > 0,05$) (obr. 13.E na str. 37). Již při +100 mV skoku je však patrné, že zatímco proudy hTRPA1 exponenciálně rostly již na začátku pulzu (tedy kanály byly při této depolarizaci již aktivovány), u hTRPA1-dTM5 je během napěťového pulzu zřetelný jen velmi nepatrný růst (obr. 13.F na str 37).

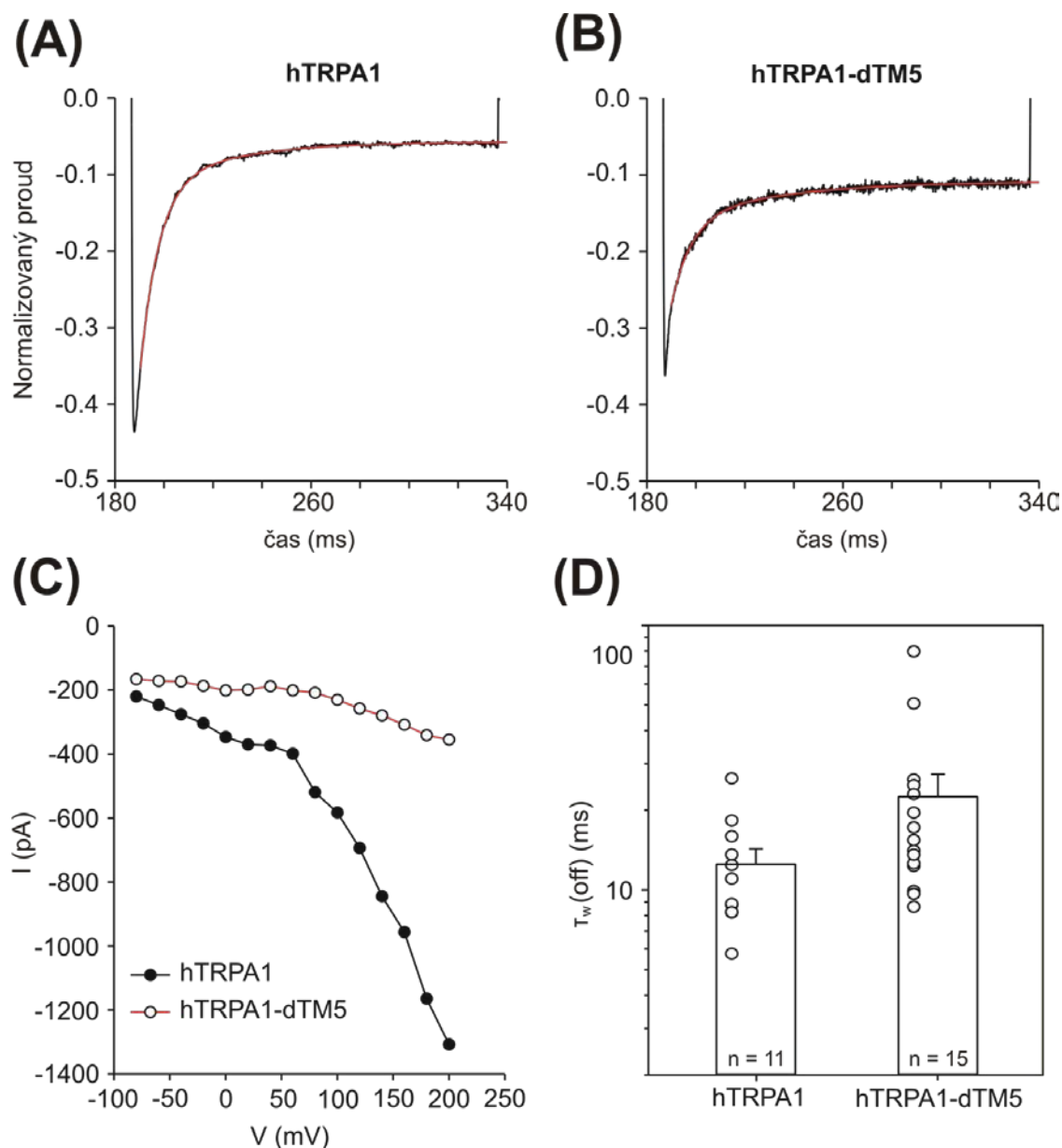
4.7 Vyhodnocení kinetiky deaktivace

Při vysokých hodnotách kladných membránových potenciálů jsou TRPA1 kanály aktivovány, což vede k jejich otevření a toku kladných iontů ven z buňky. Pokud v této fázi dojde k bezprostřední a dostatečně silné hyperpolarizaci membránového potenciálu, začnou ještě otevřenými kanály proudit ionty dovnitř buňky, než se TRPA1 vlivem změny membránového potenciálu deaktivují a zavřou. Amplituda proudových odpovědí tak exponenciálně klesá, až dosáhne nového rovnovážného stavu.



Obr. 12: Aktivace hTRPA1 a hTRPA1-dTM5. Průměrné proudové odpovědi hTRPA1 z 10 buněk (A) a hTRPA1-dTM5 ze 7 buněk (B) naměřené za použití protokolu 2 a normalizované na maximální amplitudu membránového proudu při +200 mV (červená šipka označuje oblast, ve které byl ze záznamu odečítán proud). Červeně je vyznačena poslední stimulace napěťovým protokolem, při které došlo ke skoku z 0 mV na +200 mV po dobu 150 ms, s následným skokem na -140 mV po dobu 150 ms. Oblast skoku na kladný membránový potenciál byl proložen jednou, případně součtem dvou exponenciálních funkcí (C, D), ze kterých byly získány vážené průměry aktivačních časových konstant $\tau_w(\text{on})$ (E). Stupnice průměrných časových konstant je logaritmická, kroužky znázorňují jednotlivé hodnoty. (F) Porovnání průměrných proudů hTRPA1 a hTRPA1-dTM5 při +100 mV.

Záznam, pořízený pomocí protokolu 2, v oblasti napětového skoku na membránový potenciál -140 mV z původních +200 mV byl proložen jednou, případně součtem dvou exponenciál (obr. 14.A-B). Zároveň byly odečteny průměrné hodnoty amplitudy maximálních proudů v oblasti těsně po daném skoku na -140 mV, a to pro všechny napětové stimule od -80 mV do +200 mV.

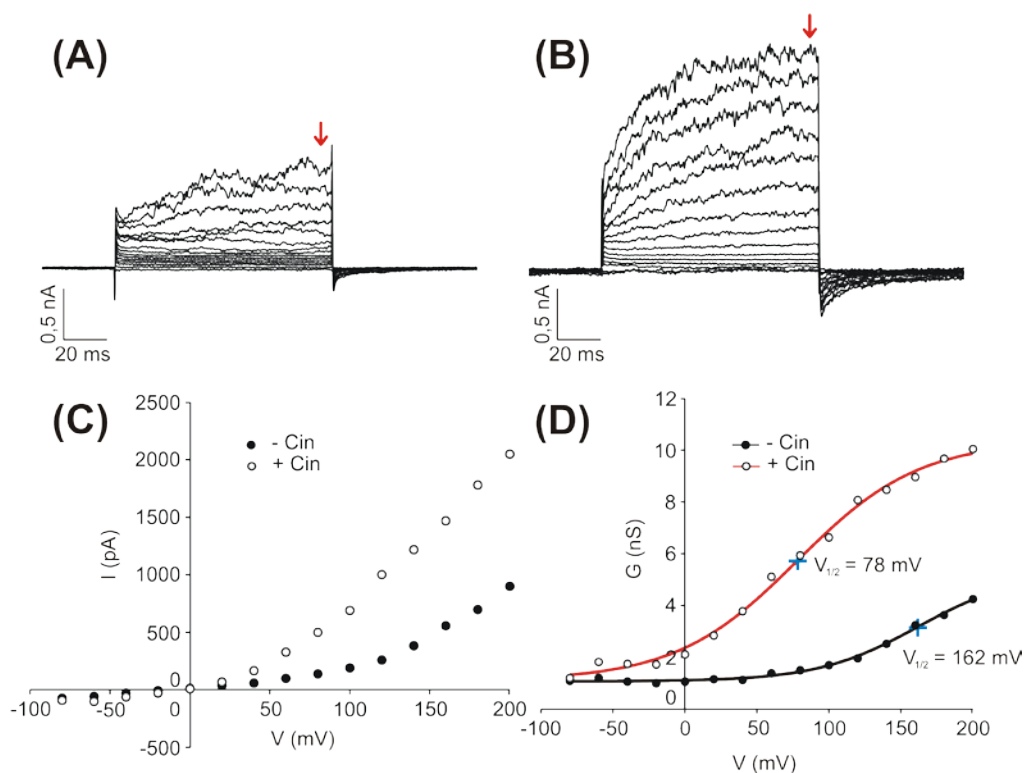


Obr. 14: Deaktivace hTRPA1 a hTRPA1-dTM5. Časový průběh membránového proudu, měřeného aplikací protokolu 2 na transfekované HEK 293T buňky, byl v oblasti deaktivačního skoku na -140 mV proložen vhodným počtem exponenciálních funkcí (A, B), ze kterých byly zjištěny vážené průměry deaktivačních časových konstant $\tau_w(\text{off})$ (C). Z průměrných záznamů z hTRPA1 ($n = 13$) a hTRPA1-dTM5 ($n = 14$) pro všechny stimule byly odečteny hodnoty proudů krátce po skoku na -140 mV (D).

U hTRPA1-dTM5 byly oproti hTRPA1 při membránovém potenciálu -140 mV nižší toky iontů dovnitř buňky, což se výrazněji projevilo při vyšších membránových potenciálech předcházejících hyperpolarizaci (obr. 13.C na str. 38). Časové konstanty u chimérického konstruktu byly statisticky významně vyšší, než u divokého typu ($\tau_w(off) = 22,5 \text{ ms} \pm 4,9 \text{ ms}$ pro hTRPA1-dTM5; $n = 15$, $\tau_w(off) = 12,5 \text{ ms} \pm 1,8 \text{ ms}$ pro hTRPA1; $n = 11$, $P < 0,05$) (obr. 13. D na str. 38).

4.8 Aktivace skořicovým aldehydem

Pro zjištění, zda je u chiméry hTRPA1-dTM5 zachována citlivost na skořicový aldehyd (Cin), byl použit roztok Cin o koncentraci 100 μM . Po několika sériích napětových skoků (obr. 15.A) byl na buňku, nacházející se v 2 ml extracelulárního roztoku, postupně přikapán celkem 1 ml roztoku Cin, přičemž na buňku byly stále aplikovány napětové skoky (obr. 15.B).



Obr. 15: Aktivace TRPA1 skořicovým aldehydem (Cin). Na obrázku jsou zobrazeny rozdílné proudové odpovědi ukázkové buňky HEK 293T, exprimující hTRPA1-dTM5, na napětové skoky protokolu 1 bez přidavku Cin (A) a v prostředí Cin o koncentraci 33 μM (B). Naměřená data byla filtrována 1200 Hz digitálním Besselovým filtrem. Z maximálních amplitud membránového proudu (odečtených z oblasti znázorněné šipkou) byla sestrojena I/V závislost (C). Hodnoty proudu byly převedeny na vodivost, pro zjištění polovičního účinného napětí $V_{1/2}$ byly získané body proloženy Boltzmannovou funkcí (D). Poloviční účinná napětí jsou znázorněna křížkem.

Z naměřených dat byla zkonstruována I/V závislost, která byla převedena na vodivost. Přidáním C_{in} se výrazně zvýšily proudové odpovědi buňky - maximální hodnota membránového proudu při +200 mV bez C_{in} činila 900 pA, po přidání C_{in} se proud zvýšil na 2000 pA (obr. 15.C na str. 39). Zároveň došlo vlivem C_{in} ke značnému posunu polovičního účinného napětí ze 162 mV na 78 mV (obr. 15.D na str. 39).

5. Diskuse

Experimentální část předložené práce je věnována zkoumání vlivu strukturálních rozdílů TRPA1 orthologů na aktivaci napětím. Pro tento účel byly porovnávány specifické aktivační a deaktivující charakteristiky lidského orthologu TRPA1 (hTRPA1) s vlastnostmi chiméry, ve které je zaměněna 5. transmembránová doména hTRPA1 za homologní část receptoru octomilky obecné (hTRPA1-dTM5). Cílem práce bylo zjistit, zda je TM5 funkčně významná pro aktivaci hTRPA1 depolarizujícím napětím a do jaké míry se tato doména podílí na univerzálním vrátkovacím mechanismu iontového kanálu.

Vlastnosti lidského a chimérického kanálu byly studovány snímáním proudových odpovědí celé buňky metodou *patch-clamp* v uspořádání *whole-cell*. Pro tento účel byly eukaryotní buňky HEK 293T transfekovány genem, kódujícím iontové kanály, ve vektoru s CMV promotorem. TRPA1 receptor tak expresí mnohonásobně předčí expresi ostatních (endogenních) iontových kanálů HEK buněk, proudové odpovědi zprostředkované aktivací TRPA1 kanálů pak výrazně převažují. Proudové odpovědi transfekovaných buněk se daly ve všech případech odlišit od netransfekovaných.

Inaktivace membránového proudu při vysokém depolarizačním potenciálu, která byla pozorována ve studii autorů Xiao et al. [34], nebyla v našich měřeních zaznamenána. Příčinou rozdílných výsledků mezi naší studií a uvedenou publikací mohou být různá složení experimentálních roztoků, nebo možnost, že publikované záznamy byly pořízeny na buňkách, které byly předtím chemicky stimulovány. V našem případě byly v extracelulárním roztoku přítomny vápenaté ionty, které však průběh proudů vyvolaných depolarizací podle našich dřívějších zjištění neovlivňují. Naopak zkušenosti naší laboratoře ukazují, že k podobné deaktivaci dojde po předchozí aktivaci hTRPA1 skořicovým aldehydem, nebo AITC.

Naše výsledky jednoznačně prokazují, že chiméra hTRPA1-dTM5 má sníženou citlivost k depolarizačnímu napětí, což je v souladu s prací [34]. Poloviční účinné napětí se nám podařilo stanovit pouze u 6 z 15 měřených buněk u hTRPA1, zjištěná hodnota $V_{1/2}$ je v souladu s již publikovanou studií, ve které byl vyhodnocen robustnější soubor buněk ($V_{50} = 128,0 \pm 2,7$ mV pro hTRPA1) [31]. U konstruktu hTRPA1-dTM5 bylo stanovení $V_{1/2}$ obtížnější, numerický výpočet se zdařil jen u 5 ze 17 buněk. Důvodem byla nižší proudová odpověď chiméry. Je možné, že vzhledem k posunu $V_{1/2}$ blíže k horní hranici aplikovaného napětí nebylo v některých záznamech pozorováno přiblížení se ke stavu

úplné aktivace kanálů. Lze očekávat, že s větším počtem měření při více kladných potenciálech by u hTRPA1-dTM5 receptoru bylo možné hodnotu $V_{1/2}$ stanovit.

Nepodařilo se statisticky prokázat zpomalení aktivace chimérického kanálu. Důvodem byla zřejmě různá míra exprese v každé buňce, nedostatečná doba trvání napěťového pulzu a relativně silný vliv bazálních proudů v HEK 293T buňkách. V předchozí práci uskutečněné v naší laboratoři byla pro hTRPA1 stanovena mírně pomalejší aktivační časová konstanta ($\tau_{on} = 59 \pm 5$ ms) [31], byla však stanovena při nižším membránovém potenciálu +160 mV, což hodnotu $\tau_w(on)$ ovlivnilo. K získání přesnějších dat by bylo zapotřebí aktivace vyšším membránovým potenciálem, delší doba aktivačního pulzu, nebo vyhodnocení většího souboru buněk.

V hyperpolarizační fázi stimulace vykazovala chiméra TRPA1 nižší proudovou odpověď a zpomalenou deaktivaci. Vyšší časová konstanta deaktivace odráží pomalejší návrat TRPA1 kanálu do zavřené konformace. Mutací v TM5 byla zřejmě narušena oblast související s převodem membránového potenciálu na uzavírání kanálu.

Naše předběžné výsledky ukazují, že aplikací skořicového aldehydu došlo k posunu napěťové citlivosti chimérických receptorů směrem k záporným membránovým napětím, což svědčí o zachování chemické citlivosti a alosterického působení obou podnětů. Toto zjištění je v souladu s výše uvedenou studií [34], kde byl pro stanovení míry chemické aktivace hTRPA1-dTM5 použit roztok AITC o koncentraci 100 μ M. Přestože nebyl zjištěn významný rozdíl v poloviční účinné koncentraci AITC ($EC_{50} = 2,33 \pm 0,74$ μ M u chiméry versus $1,32 \pm 0,46$ μ M u divokého typu), autoři dokumentují ve srovnání s divokým typem snížení průměrné amplitudy proudových odpovědí.

Z našich výsledků vyplývá, že TM5 je významná pro aktivaci změnami membránového potenciálu. TM5 lidského TRPA1 obsahuje dvě pozitivně nabitá rezidua, Lys868 a Arg872, která jsou potenciálními napěťovými senzory. Ta jsou v chiméře nahrazena glutaminem a lysinem. Vzhledem k tomu, že lysin na pozici 872 zachovává kladný náboj, je pravděpodobné, že mutace Lys868Gln je hlavní příčinou snížené citlivosti chiméry k napětí. TM5 byla mimo jiné rozpoznána jako oblast specifická pro interakci hTRPA1 s mentholem [34]. Rozdíl ve farmakologických účincích mentholu na savčí a hmyzí orthology TRPA1 vedl autory k sérii chimérických pokusů. Ukázalo se, že chiméra hTRPA1-dTM5 nevykazovala oproti lidskému TRPA1 známky aktivace na 250 μ M menthol. Využitím dalších chimérických konstruktů s jemnější substitucí v méně konzervované části TM5 byla identifikována dvě rezidua (Ser876 a Thr877), zodpovědná

za aktivaci mentholem. Je pozoruhodné, že poloviční účinná koncentrace pro AITC byla u této chiméry signifikantně snížena ($EC_{50} = 2.33 \pm 0.74 \mu\text{M}$ versus $0.85 \pm 0.10 \mu\text{M}$) a maximální odpověď dosahovala jen poloviny maximální odpovědi divokého typu. Skutečnost, že záměna menší oblasti TM5 vyvolává větší funkční změnu než záměna celé TM5, by svědčila spíše o komplexně porušeném aktivačním mechanismu, než o porušeném vazebném místě pro mentol.

Mutací v TM5 doméně mohlo dojít k narušení vrátkovacího mechanismu. Současné představy o vrátkování TRP kanálů vycházejí z nedávno publikované struktury TRPV1 [16], podle které otevření kanálu zahrnuje laterální posun TM4-TM5 oblasti, která je v kontaktu s cytoplasmatickou částí TM6, a také horizontální posun α -helikální TRP domény, bezprostředně navazující na TM6 segment. Podíl pórového helixu TRPA1, obdoby α -helikální domény u TRPV1, na mechanismu vrátkování je podpořen studií, ve které došlo mutací Leu906 v pórovém helixu k obrácení směru toku iontů skrz kanál v závislosti na membránovém potenciálu [50]. V této práci byla vyslovena hypotéza, že pórový helix se uplatňuje bimodálně, tedy v napět'ově závislé aktivaci a inaktivaci TRPA1. Podle homologního modelu TRPA1 vytvořeného na základě draselného kanálu Kv1.2-Kv2.1, který má k dispozici laboratoř, kde byla napsána tato bakalářská práce, se pórový helix nachází v těsné blízkosti TM5. Je tedy možné, že převod napět'ového signálu z vnějšího póru je zprostředkován kontaktem s TM5 doménou. Zjištění, zda tato možnost vysvětluje bimodální účinek membránového napětí, je jedním z možných témat příští studie. V souhrnu naše výsledky podporují představu, podle které má TM5 důležitou úlohu v převodu napět'ových podnětů.

6. Závěr

V předložené bakalářské práci se podařilo amplifikovat plasmid s insertem chiméry lidského TRPA1 se zaměněnou TM5 za homologní část receptoru octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Amplifikovanou cDNA jsme úspěšně izolovali v množství dostatečném pro experimenty a správnost insertu cDNA ověřili sekvenací.

Podařilo se transfekovat HEK 293T buňky cDNA s genem pro expresi lidského a chimérického TRPA1. Buňky exprimovaly oba proteiny v množství dostatečném pro elektrofyziologická měření.

Metodou *patch-clamp* jsme určili a vzájemně porovnali aktivační a deaktivací charakteristiky lidského a chimérického TRPA1 kanálu. U obou forem jsme získali hodnoty polovičního účinného napětí a časové konstanty aktivace a deaktivace. Chimérický konstrukt měl oproti lidskému TRPA1 napět'ovou citlivost posunutou ke kladným hodnotám membránového potenciálu, což svědčí o jeho nižší citlivosti k tomuto aktivačnímu podnětu. Prokázali jsme také kvalitativní rozdíl při depolarizaci na +100 mV. U chimérického konstruktu byl prokazatelně narušen proces deaktivace kanálu. Současně byla ověřena citlivost chiméry na skořicový aldehyd.

Naše výsledky jsou v souladu s hypotézou, že 5. transmembránová doména je důležitou oblastí, která určuje citlivost lidského TRPA1 k depolarizačnímu membránovému potenciálu a přispívá k univerzálnímu mechanismu vrátkování iontového kanálu.

7. Použitá literatura

1. Nilius, B., Appendino, G., Owsianik, G.: *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)* 464, 425-458 (2012)
2. Andrade, E.L., Meotti, F.C., Calixto, J.B.: *Pharmacology and Therapeutics* 133, 189-204 (2012)
3. Jaquemar, D., Schenker, T., Trueb, B.: *J Biol Chem* 274, 7325-7333 (1999)
4. Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A.: *Cell* 112, 819-829 (2003)
5. Earley, S.: *British journal of pharmacology* 167, 13-22 (2012)
6. Kaji, I., Yasuoka, Y., Karki, S., Kuwahara, A.: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 302, G690-701 (2012)
7. Jain, A., Bronneke, S., Kolbe, L., Stab, F., Wenck, H., Neufang, G.: *Pain* 152, 2765-2772 (2011)
8. Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J.O., Sun, C., Walter, K., Yao, B., Kim, D.: *Nature communications* 4, 2501 (2013)
9. Kwan, K.Y., Glazer, J.M., Corey, D.P., Rice, F.L., Stucky, C.L.: *J Neurosci* 29, 4808-4819 (2009)
10. Bautista, D.M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H.E., Sterner, O., Hogestatt, E.D., Julius, D., Jordt, S.E., Zygmunt, P.M.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12248-12252 (2005)
11. Wang, Y.Y., Chang, R.B., Waters, H.N., McKemy, D.D., Liman, E.R.: *J Biol Chem* 283, 32691-32703 (2008)
12. Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., Mori, Y.: *Channels* 2, 287-298 (2008)
13. Bianchi, B.R., Zhang, X.F., Reilly, R.M., Kym, P.R., Yao, B.B., Chen, J.: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 341, 360-368 (2012)
14. Cvetkov, T.L., Huynh, K.W., Cohen, M.R., Moiseenkova-Bell, V.Y.: *Journal of Biological Chemistry* 286, 38168-38176 (2011)
15. Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., Julius, D.: *Nature* 504, 113-118 (2013)
16. Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y.: *Nature* 504, 107-112 (2013)
17. Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., Patapoutian, A.: *Nature* 445, 541-545 (2007)
18. Hinman, A., Chuang, H.H., Bautista, D.M., Julius, D.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19564-19568 (2006)
19. Hu, H., Bandell, M., Petrus, M.J., Zhu, M.X., Patapoutian, A.: *Nat Chem Biol* 5, 183-190 (2009)
20. Cvetkov, T.L., Huynh, K.W., Cohen, M.R., Moiseenkova-Bell, V.Y.: *The Journal of biological chemistry* 286, 38168-38176 (2011)
21. Surá, L., Zíma, V., Touška, F., Vlachova, V.: *Bolest* 13, 109-114 (2010)
22. Wang, L., Cvetkov, T.L., Chance, M.R., Moiseenkova-Bell, V.Y.: *The Journal of biological chemistry* 287, 6169-6176 (2012)
23. Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y., Yamamoto, S., Naito, S., Knevels, E., Carmeliet, P., Oga, T., Kaneko, S., Suga, S., Nokami, T., Yoshida, J., Mori, Y.: *Nature chemical biology* 7, 701-711 (2011)
24. Caterina, M.J.: *Nature* 445, 491-492 (2007)

25. Doerner, J.F., Gisselmann, G., Hatt, H.,Wetzel, C.H.: *J Biol Chem* 282, 13180-13189 (2007)
26. Banke, T.G., Chaplan, S.R.,Wickenden, A.D.: *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C1457-1468 (2010)
27. Bobkov, Y.V., Corey, E.A.,Ache, B.W.: *Biochimica et biophysica acta* 1808, 1120-1128 (2011)
28. Benedikt, J., Samad, A., Ettrich, R., Teisinger, J.,Vlachova, V.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 1279-1288 (2009)
29. Kalia, J.,Swartz, K.J.: *Scientific reports* 3, 1523 (2013)
30. Samad, A., Sura, L., Benedikt, J., Ettrich, R., Minofar, B., Teisinger, J.,Vlachova, V.: *Biochemical Journal* 433, 197-204 (2011)
31. Sura, L., Zima, V., Marsakova, L., Hynkova, A., Barvik, I.,Vlachova, V.: *Journal of Biological Chemistry* 287, 18067-18077 (2012)
32. Chen, J., Zhang, X.F., Kort, M.E., Huth, J.R., Sun, C., Miesbauer, L.J., Cassar, S.C., Neelands, T., Scott, V.E., Moreland, R.B., Reilly, R.M., Hajduk, P.J., Kym, P.R., Hutchins, C.W.,Faltynek, C.R.: *J Neurosci* 28, 5063-5071 (2008)
33. Nagatomo, K., Ishii, H., Yamamoto, T., Nakajo, K.,Kubo, Y.: *Biophysical journal* 99, 3609-3618 (2010)
34. Xiao, B., Dubin, A.E., Bursulaya, B., Viswanath, V., Jegla, T.J.,Patapoutian, A.: *J Neurosci* 28, 9640-9651 (2008)
35. Cordero-Morales, J.F., Gracheva, E.O.,Julius, D.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E1184-1191 (2011)
36. <http://www.phylogeny.fr>, (přístup 26.2. 13:37, 2014)
37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (přístup 26.2. 13:27, 2014)
38. Kang, K., Pulver, S.R., Panzano, V.C., Chang, E.C., Griffith, L.C., Theobald, D.L.,Garrity, P.A.: *Nature* 464, 597-600 (2010)
39. Prober, D.A., Zimmerman, S., Myers, B.R., McDermott, B.M., Jr., Kim, S.H., Caron, S., Rihel, J., Solnica-Krezel, L., Julius, D., Hudspeth, A.J.,Schier, A.F.: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 10102-10110 (2008)
40. Saito, S., Banzawa, N., Fukuta, N., Saito, C.T., Takahashi, K., Imagawa, T., Ohta, T.,Tominaga, M.: *Molecular biology and evolution* 31, 708-722 (2014)
41. Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J.,Patapoutian, A.: *Neuron* 41, 849-857 (2004)
42. Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B.,Voets, T.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1273-1278 (2009)
43. Gracheva, E.O., Ingolia, N.T., Kelly, Y.M., Cordero-Morales, J.F., Hollopeter, G., Chesler, A.T., Sanchez, E.E., Perez, J.C., Weissman, J.S.,Julius, D.: *Nature* 464, 1006-1011 (2010)
44. Hamada, F.N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S.R., Ghezzi, A., Jegla, T.J.,Garrity, P.A.: *Nature* 454, 217-220 (2008)
45. Zhong, L., Bellemer, A., Yan, H., Ken, H., Jessica, R., Hwang, R.Y., Pitt, G.S.,Tracey, W.D.: *Cell reports* 1, 43-55 (2012)
46. Hwang, R.Y., Stearns, N.A.,Tracey, W.D.: *PloS one* 7, e30090 (2012)
47. Kremeyer, B., Lopera, F., Cox, J.J., Momin, A., Rugiero, F., Marsh, S., Woods, C.G., Jones, N.G., Paterson, K.J., Fricker, F.R., Villegas, A., Acosta, N., Pineda-Trujillo, N.G., Ramirez, J.D., Zea, J., Burley, M.W., Bedoya, G., Bennett, D.L., Wood, J.N.,Ruiz-Linares, A.: *Neuron* 66, 671-680 (2010)

48. Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Hogestatt, E.D., Meng, I.D., Julius, D.: *Nature* 427, 260-265 (2004)
49. Ding, Z., Gomez, T., Werkheiser, J.L., Cowan, A., Rawls, S.M.: *European journal of pharmacology* 578, 201-208 (2008)
50. Wan, X., Lu, Y., Chen, X., Xiong, J., Zhou, Y., Li, P., Xia, B., Li, M., Zhu, M.X., Gao, Z.: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* (2013)
51. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/flpin_pcdna5frt_man.pdf, (přístup 17.5. 2014, 12:52)
52. <http://www.origene.com/cdna/vectordiagram.msp>, (přístup 17.5.2014, 12:48)
53. http://www.origene.com/assets/documents/catalog_manual/otiproductmanual-pcmvapplicationguide.pdf, (přístup 17.5.2014, 12:42)
54. Hille, B.: *Ionic channels of excitable membranes*. 3rd Edition ed Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts (2001)
55. Xie, M.J., Ma, Y.G., Gao, F., Bai, Y.G., Cheng, J.H., Chang, Y.M., Yu, Z.B., Ma, J.: *American journal of physiology. Cell physiology* 298, C1489-1500 (2010)

