

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Katedra lékařské biofyziky

AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV, V.V.I.

Mgr. Lenka Gryčová

**Studium vztahů mezi strukturou a funkcí
C- konce vaniloidního receptoru TRPV1**

Disertační práce

Praha 2008

Univerzita Karlova v Praze

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Katedra lékařské biofyziky

Akademie věd České Republiky

FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV, v.v.i.

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Studium vztahů mezi strukturou a funkcí C-
konce vaniloidního receptoru TRPV1**

Mgr. Lenka Gryčová

Školitel: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D., Ing. Jan Teisinger, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Evžen Amler, CSc.

Praha 2008

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě během mého studia podporovali, zejména pak **Ing. Janu Teisingerovi CSc.** za vytvoření dobrých pracovních podmínek po celou dobu mého působení na Oddělení proteinových struktur, finanční podporu, četné konzultace a odborné vedení. Velký dík patří také mému školiteli **doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D.** za trpělivost a cenné konzultace, které mi poskytoval během práce na mé disertaci. Děkuji také mému školiteli - konzultantovi **doc. RNDr. Evženovi Amlerovi, CSc.** Ráda bych také poděkovala **RNDr. Martinovi Kubalovi Ph.D.** a **RNDr. Zdeňkovi Lánskému Ph.D.** za pomoc při měření časově rozlišené fluorescence a mnoho rad týkajících se fluorescenčních měření a vyhodnocování dat.

Děkuji také mému manželovi a rodičům za podporu a toleranci během celého mého studia.

Tato práce vznikla na oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu v.v.i. Akademie Věd České Republiky. Základem práce jsou články, jejichž kopie jsou nedílnou součástí tohoto textu.

Gryčová, L., Lánský, Z., Friedlová, E., Vlachová, V., Kubala, M., Obšilová, V., Obšil, T., Teisinger, J. (2007) ATP binding site on the C-terminus of the vanilloid receptor. Arch Biochem Biophys. Sep 15;465(2):389-98

Gryčová L., Lánský, Z., Friedlová, E., Obšilová, V., Janoušková, H., Obšil, T., Teisinger, J. (2008) Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 375: 680 -683

Ostatní publikace autorky:

Mazna, P., **Gryčová L.**, Balík, A., Zemková, H., Friedlová, E., Obšilová, V., Obšil, T., Teisinger, J., (2008) The role of proline residues in the structure and function of human MT2 melatonin receptor. J Pineal Res. Jun 9. [Epub ahead of print]

Konference:

Gryčová L., Lánský, Z., Friedlová, E., Teisinger, J. (2008) TRPV1 C-terminus multiple binding sites studies using fluorescence spectroscopy and molecular modeling. FEBS JOURNAL 275, 450-450

Friedlová, E., **Gryčová L.**, Lánský, Z., Šulc, M., Teisinger, J. (2008) Identification of amino acid residues essential for binding of calmodulin in C-terminal region of TRPC6. FEBS JOURNAL 275, 217-217

Gryčová L., Lánský, Z., Friedlová, E., Teisinger, J. (2007) Identification of calmodulin binding site on the isolated C-terminus TRPV1. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 102, 260-260

Friedlová E., **Gryčová L.**, Lánský, Z., Šulc, M., Teisinger, J. (2007) Mapping of calmodulin-binding site on the C-tail of TRPC6 channel. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 102, 259-259

Kubala, M., **Gryčová L.**, Lánský, Z., Otyepka, M., Sklenovský, P., Teisinger, J. (2007) Conformational changes of the cytoplasmic part of Na⁺/K⁺-ATPase induced by the ligand binding. FEBS JOURNAL 274, 127-127

Šimunová, L., Lánský, Z., Friedlová, E., Kubala, M., Teisinger, J. (2006) K735 is the key residue for the ATP-binding to the TRPV1. FEBS JOURNAL 273, 328-328

SEZNAM ZKRATEK

AA	aminokyselina
ABC	ATP vazebná kazeta
Amp	antibiotikum – ampicilin
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bazí
β ME	Beta-Mercaptoetanol
CaM	kalmodulin
CaM-BD	vazebná doména pro kalmodulin
CD	cirkulární dichroismus
CFTR	gen pro cystickou fibrosu (cystic fibrosis transmembraneregulator)
Da	jednotky hmotnosti, běžně používané v biomedicínských vědách, jeden Da představuje molární hmotnost atomu vodíku.
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	směs nukleotidů dATP, dTTP, dCTP, dGTP
DRG	dorsal root ganglion, ganglion zadních kořenů míšních, spinální ganglion
DTT	dithiotreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
FHIT	protein fragilní histidinové triady (Fragile Histidine Triad Protein)
FITC	Fluorescein isothiokyanat
GST	glutathione-S-transferase
HCN2	kanál otevíraný cyklickými nukleotidy (cyclic nucleotide-gated channel)
12-HPETE	12-hydroperoxyeicosatetraenová kyselina
HisP	histidinová permeasa

His tag	histidinová kotva
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
IRF	signál zdroje a odezva přístroje (instrument response function)
LB	název média dle Luria-Bertaniho
MLCK	kinasa lehkého řetězce myosinu (myosin light chain kinase)
NBD	vazebná doména pro nukleotidy (nukleotide binding domain)
NADA	N-arachidonoyl dopamin
NMR	nukleární magnetická rezonance
O.D.	optická hustota
OEA	oleylethanolamid
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIP ₂	fosfatidylinositol(4,5)-bisfosfát
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PLC	phospholipasou C
RPM	otáčky za minutu
RT	pokožová teplota
RTX	resiniferatoxin
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS - polyakrylamidová gelová elektroforéza
TAP1	transportní protein asociovaný se zpracováním antigenů
TCSPS	počítání fotonů (time-correlated single-photon counting)
TNP-ATP	2'(3')-O-(2,4,6-trinitrofenyl)adenosin-5'-trifosfát
Tris	Tris-(hydroxymetyl)-aminometan
TRP	Transient receptor potential
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
TRPV1-CT	Transient receptor potential vanilloid 1 C- konec

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
OBSAH	10
1. ÚVOD	12
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1 Rodina iontových kanálů TRP	13
2.2 Podrodina TRPV	14
2.3 Vaniloidní receptor TRPV1	15
2.3.1 Biologická funkce TRPV1	15
2.3.2 Aktivace a regulace TRPV1	16
2.3.2.1 Účinek kapsaicinu	16
2.3.2.2 Vliv pH	17
2.3.2.3 Aktivace teplem	18
2.3.2.4 Desenzitizace	19
2.3.2.5 Permeabilita	21
2.3.2.6 Senzitizace TRPV1	21
2.3.2.9 Fosforylace kalmodulinkinasou II	23
2.3.2.10 Modulace lipidy	23
2.3.3 Struktura TRPV1	24
2.3.3.1 Cytoplazmatický N- konec TRPV1	26
2.3.3.2 Cytoplazmatický C- konec TRPV1	27
3. CÍLE PRÁCE	35
4. MATERIÁL A METODY	36
4.1 Konstrukce expresních plazmidů	36
4.2 Bodové mutace pomocí polymerasové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR)	36
4.3 Exprese a purifikace TRPV1-CT proteinů pro vazebné studie ATP	39
4.4 Exprese a purifikace TRPV1-CT proteinů pro vazebné studie kalmodulinu	40
4.5 Fluorescenční spektroskopie	41
4.5.1 Fluorescenční sonda TNP-ATP	41
4.5.1.1 Stanovení disociační konstanty pro TNP-ATP	41
4.5.1.2 Stanovení disociační konstanty pro ATP	43
4.5.2 Fluorescenční sonda fluorescein isothiokyanat (FITC)	43
4.5.2.1 Značení sondou FITC	43
4.5.2.2 Zhášení fluorescence	44
4.5.2.3 Časově rozlišené měření dohasínání fluorescence FITC	44
4.5.3 Fluorescenční sonda Alexa Fluor 488	45
4.5.3.1 Měření vazby kalmodulinu pomocí anisotropie fluorescence	45
4.6 CD spektroskopie	46
4.7 Modelování struktury na základě homologie	47
4.7.1 Model izolovaného C – konce TRPV1	47
4.7.2 Model izolovaného C– konce TRPV1 s ATP a TNP-ATP	48
4.7.3 Model kalmodulin vazebného místa na C- konci TRPV1	48
4.7.4 Model komplexu vazebného místa pro kalmodulin na C– konci TRPV1 s Ca ²⁺ - kalmodulinem	49
5. DISKUSE A VÝSLEDKY	50
5.1 ATP vazebné místo na C- konci vaniloidního receptoru TRPV1	50
5.1.1 Vazba TNP-ATP	51
5.1.2 Vazba ATP	53
5.1.3 Značení fluorescenční sondou FITC	55

5.1.4 Zhášení FITC	56
5.1.5 Dohasínání fluorescence FITC	56
5.1.6 Molekulární model C- konce TRPV1 s molekulami ATP a TNP-ATP....	58
5.1.7 Diskuse k práci I.	62
5.2 Iontové interakce hrají klíčovou roli při vazbě C- konce TRPV1 na kalmodulin	65
5.2.2 Vazba kalmodulinu na C- konec TRPV1.....	67
5.2.3 Molekulární model C- konce TRPV1 v komplexu s kalmodulinem	70
5.2.4 Diskuse k práci II.	75
6. ZÁVĚR	77
7. Seznam použité literatury	92

1. ÚVOD

Biologická funkce biopolymerů je podmíněna uspořádáním do unikátního prostorového tvaru. Studium struktury bílkovin přináší řadu informací o jejich funkci. Vyřešení struktury proteinu nám dovoluje vysvětlit funkci jeho jednotlivých aminokyselin. U enzymů umožňuje určit aminokyselinové zbytky, které tvoří katalytické centrum. U receptorů dovoluje určit místo, kde se váže ligand („ligand binding site“).

Mezi dvě dnes nejrozšířenější metody studia terciární struktury proteinů patří rentgenová krystalografie a nukleární magnetická resonance. Obě tyto metody podávají strukturní informace, nicméně podléhají určitým omezením. U metody NMR je to především velikost zobrazované struktury. Krystalografie se zase potýká s nutností získat dostatečně kvalitní krystal, což může být v mnoha případech podmínkou nepřekonatelnou. Tato metoda je velmi časově náročná. Poskytuje cenná data o struktuře proteinu, avšak spíše statického charakteru, která neobsahují informaci o dynamice. Struktura některých částí proteinové molekuly může zůstat tedy neznámá i po její vyřešení v důsledku vysoké flexibility.

Proto se vedle těchto dvou metod uplatňuje i další způsob studia terciární struktury proteinů, který je spojen s rozvojem počítačového modelování. Na základě podobnosti - homologie s proteiny se známou strukturou je možné predikovat strukturu neznámou a ve spojení s dalšími metodami z oblasti molekulární biologie, biochemie nebo biofyziky přináší řadu strukturně funkčních údajů.

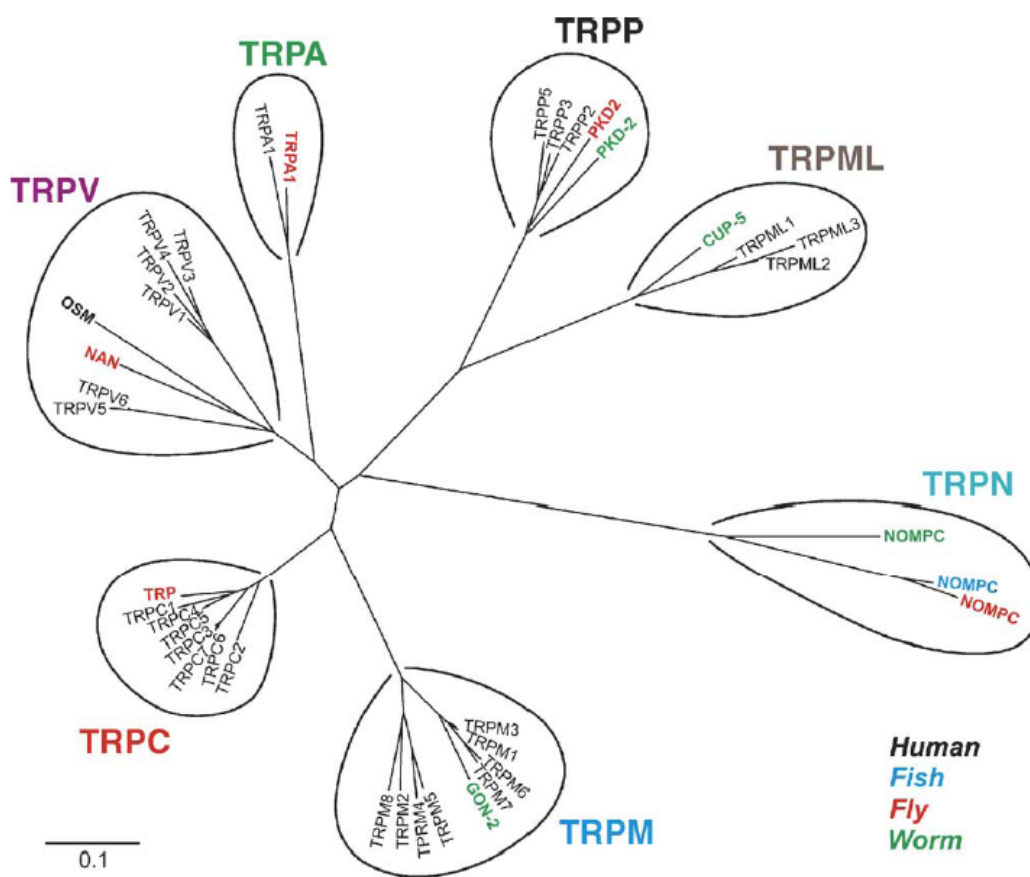
Tato metoda studia protein/ ligand a protein/protein interakcí byla využita také při získání hlubších poznatků týkajících se iontového kanálu TRPV1. V periferních sensorických neuronech funguje TRPV1 jako molekulární integrátor bolestivých podnětů jako je kapsaicin, kyselé pH a teplo. Tento iontový kanál je v popředí zájmu zejména v souvislosti s vyhledáváním nových antagonistů pro specifickou blokaci ve snaze získání nových látek pro léčbu bolesti.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Rodina iontových kanálů TRP

Od roku 1989, kdy byl identifikován první člen dnes již rozsáhlé rodiny TRP receptorů *Drosophila* TRP (dTRP) (Montell and Rubin 1989), se tato skupina iontových kanálů těší velkému zájmu. Je to především díky jejich klíčové roli ve fyziologii smyslů jako je zrak, chuť, sluch, termo-, mechano- a osmopercepce. TRP receptory vykazují značnou diversitu pokud jde o mechanismy aktivace i iontovou selektivitu. TRP receptory umožňují vstup Ca^{2+} do buňky. Ca^{2+} má zásadní význam pro mnoho buněčných procesů jako je svalová kontrakce, buněčná proliferace, transkripce genů a buněčná smrt (Berridge, Lipp et al. 2000).

Na základě sekvenční podobnosti je možné rozdělit TRP rodinu do sedmi podrodin (Pedersen, Owsianik et al. 2005; Voets, Talavera et al. 2005; Ramsey, Delling et al. 2006) (Obr. 1), mezi ně patří sedmi členná podrodina TRPC (canonical), osmičlenná podrodina TRPM (Melastatin), TRPA, v této podrodině byl dosud identifikován pouze jeden savčí zástupce, TRPP, TRPML. O posledních dvou jmenovaných skupinách TRP kanálů je zatím známo relativně málo informací, nicméně vzhledem ke vztahu k některým onemocněním se poznatky rychle rozšiřují. TRPV (Vanilloid) podrodinu tvoří šest savčích zástupců (TRPV1-6), u bezobratlých například *C. elegans* Osm-9 (Colbert, Smith et al. 1997) a u *Drosophily* Nanchung (Nan) (Kim, Chung et al. 2003). Osmou vzdáleně příbuznou podrodinou je TRPY, jejíž členové jsou exprimovány v kvasinkách (Palmer, Zhou et al. 2001; Denis and Cyert 2002).



Obr. 1. Fylogenetický strom TPR rodiny (Pedersen, Owsianik et al. 2005).

2.2 Podrodina TRPV

Na základě sekvenční podobnosti jsou členové podrodiny TRPV rozděleny do čtyř skupin TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4 a TRPV5/TRPV6 (Benham, Davis et al. 2002; Gunthorpe, Benham et al. 2002). První tři skupiny patří mezi neselektivní kationtové kanály, které jsou aktivovány různými podněty jako jsou teplo, chlad, navázání intracelulárních a extracelulárních ligandů nebo působení chemické či mechanické zátěže (Benham, Davis et al. 2002; Nilius, Watanabe et al. 2003; Nilius, Vriens et al. 2004). Tyto kanály jsou mírně propustné pro vápník. Naproti tomu receptory TRPV4 a TRPV5 propouštějí kalciové ionty vysoce selektivně.

Přestože není doposud známa terciární struktura těchto kanálů, předpokládá se, že sdílí podobné strukturální rysy, které byly identifikovány na již vykrytalizovaných iontových kanálech, jako jsou kanály otvírané cyklickými nukleotidy, napětově závislé

kanál příbuzný Shakeru a kanály aktivované hyperpolarizací (Kaupp and Seifert 2002; Sansom, Shrivastava et al. 2002; Robinson and Siegelbaum 2003).

Členové skupiny TRPV se skládají ze 6 transmembránových domén. Mezi 5. a 6. transmembránovou doménou se nachází krátký hydrofobní úsek ohraničující oblast póru (Owsianik, D'Hoedt et al. 2006). Intracelulárně orientované N- a C- konce se u jednotlivých kanálů liší svojí délkou i množstvím funkčních domén a motivů. TRP kanály pravděpodobně vytvářejí heteromultimerický komplex. (Caterina, Schumacher et al. 1997; Kedei, Szabo et al. 2001; Hoenderop, Voets et al. 2003; Garcia-Sanz, Fernandez-Carvajal et al. 2004).

2.3 Vaniloidní receptor TRPV1

TRPV1 neboli vaniloidní receptor, dříve také označovaný jako kapsaicinový receptor, je zakládajícím členem savčí podrodiny TRPV (Colbert, Smith et al. 1997). Dnes je pravděpodobně jedním z doposud nejlépe charakterizovaných receptorů této rodiny. TRPV1 je významně exprimován v nervové tkáni a je specifický pro primární senzorycké neurony. Byl identifikován u neuronů ganglií zadních kořenů míšních, v gangliu trojklaného nervu, nodálním gangliu neuronů a zejména ve spojení s páteřními a periferními nervovými zakončeními (Caterina, Rosen et al. 1999), ale i v dalších tkáních (Gunthorpe and Szallasi 2008).

2.3.1 Biologická funkce TRPV1

Vaniloidní receptor TRPV1 je exprimován v primárních senzoryckých neuronech. Je znám jako receptor sledující vnitřní i vnější podněty, někdy je také označován molekulárním integrátorem chemických a fyzikálních podnětů. Při jeho aktivaci dochází k vtoku kationtů do buňky spojenému s depolarizací buněčné membrány a vznikem akčního potenciálu. Tímto mechanismem je přenášena informace o bolestivých podnětech do centrální nervové soustavy. Tento iontový kanál je aktivován mnoha stimuly, které člověk vnímá jako bolestivé. Mezi ně se řadí teplota přesahující

43 °C, slabé kyseliny (Caterina, Schumacher et al. 1997), vaniloidy, mediátory zánětu (bradykinin, histamin, serotonin a prostaglandin E₂), které snižují pH v okolí poraněné tkáně (Vyklícký, Knotkova-Urbancova et al. 1998) a řadou endogenních agonistů jako je například anandamid (Zygmunt, Petersson et al. 1999). Typickým vaniloidem je aktivní složka pálivých paprik kapsaicin, dále pak kafr (Xu, Blair et al. 2005), pálivá složka obsažená v pepři (piperin) (McNamara, Randall et al. 2005) a v česneku (allicin) (Macpherson, Geierstanger et al. 2005). Kyselé pH $\leq 5,9$ zapříčiňuje posun hranice pro aktivaci kanálu. Dochází tedy k jeho otevření již za pokojové teploty (Caterina and Julius 2001). Obdobné účinky byly popsány i pro etanol (Trevisani, Smart et al. 2002), nikotin (Liu, Zhu et al. 2004), cytokininy (Zhang, Inan et al. 2005) a ATP (Kwak, Wang et al. 2000).

2.3.2 Aktivace a regulace TRPV1

2.3.2.1 Účinek kapsaicinu

Kapsaicin je účinná složka pálivých paprik, u člověka vyvolává pocit bolesti prostřednictvím aktivace vaniloidního receptoru TRPV1, který přináší informaci o bolestivém podráždění do centrální nervové soustavy (Szallasi and Blumberg 1999). Tento receptor je citlivý vůči mnoha podnětům. Dosud není znám přesný strukturní mechanismus jakým regulují fyzikální a chemické podněty jeho aktivitu. Ačkoliv krystalografické údaje nejsou dostupné, mutagenezní studie poskytly množství informací o strukturní podstatě aktivity TRPV1. Vzhledem k tomu, že kapsaicin a jeho analogy, jako je resiniferatoxin (RTX) jsou lipofilní, je poměrně pravděpodobné, že procházejí přes buněčnou membránu a působí na vnitrobuněčná vazebná místa TRPV1. Tímto způsobem může být částečně vysvětlena viditelná časová prodleva mezi expozicí kapsaicinu a pocitem pálení (Tominaga and Tominaga 2005). Přítomnost vazebných míst pro kapsaicin na cytosolické doméně TRPV1 byla demonstrována s využitím syntetických ve vodě rozpustných analogů kapsaicinu (Jung, Hwang et al. 1999). Nicméně nedávno bylo uvedeno, že pro aktivaci kanálu je nezbytný kontakt i z extracelulární strany receptoru (Vyklícký, Lyfenko et al. 2003; Gilbert, Funk et al.

2007). Kapsaicin je strukturně příbuzný s endogenními agonisty TRPV1 jako jsou anandamid (Zygmunt, Petersson et al. 1999), 12-hydroperoxyeicosatetraenová kyselina (12-HPETE) (Hwang, Cho et al. 2000) a N-arachidonyl dopamin (NADA) (Huang, Bisogno et al. 2002). Je zde tedy významný fyziologický a farmakologický zájem o identifikaci oblastí kanálů, které se zapojují do přenosu účinku těchto molekul. Byly identifikovány některé aminokyselinové zbytky, které se účastní interakce TRPV1 a kapsaicinu. Tyr 511, Ser 512 a Arg 491, lokalizované na intracelulární smyčce mezi druhou a třetí transmembránovou doménou, mohou interagovat s vaniloidy na vnitrobuněčné části membrány (Jordt and Julius 2002). Do interakce mezi TRPV1 a agonisty vaniloidních receptorů jsou pravděpodobně zapojena i další rezidua, např. v oblasti hydrofobní smyčky mezi 5. a 6. transmembránovou doménou Glu 636, Asn 646 a Glu 648 (Welch, Simon et al. 2000) nebo v oblasti obou cytoplazmaticky orientovaných konců (Jung, Lee et al. 2002; Vlachová, Teisinger et al. 2003). Analýzou savčích mezidruhových chimér TRPV1 a metodou bodových mutací TRPV1, identifikovalo několik skupin, aminokyselinový zbytek Met 547 v domnělém S4 segmentu u potkana (Leu 547 u člověka a králíka, Leu 549 u morčete) (Gavva, Klionsky et al. 2004; Chou, Mtui et al. 2004; Phillips, Reeve et al. 2004). Zdá se, že u potkana a u člověka přispívá k vazbě vaniloidů také Tyr 550 (Gavva, Klionsky et al. 2004). Navíc Arg 114 a Glu 761 lokalizované na N- a C- konci se také podílejí na rozpoznávání agonistů (Jung, Lee et al. 2002).

2.3.2.2 Vliv pH

Okyselení extracelulárního prostředí primárně ovlivňuje činnost TRPV1 dvojitým způsobem. Extracelulární protony zvyšují účinek tepla nebo kapsaicinu jakožto TRPV1 agonistů, a to snížením hranice pro aktivaci kanálu těmito podněty (Caterina, Schumacher et al. 1997). Vzhledem ke skutečnosti, že další snížení pH pod 6,0 vede k otevření kanálu za pokojové teploty, mohou být považovány extracelulární protony za agonisty samy o sobě (Tominaga, Caterina et al. 1998). Předpokládá se, že extracelulární protony mají primárně vliv spíše na zvýšení pravděpodobnosti otevření kanálu než ovlivnění hodnot vodivosti nebo přímou interakci s vazebným místem pro vaniloidy (Tominaga, Caterina et al. 1998; Baumann and Martenson 2000). S využitím

metody mutagenezní analýzy byl objeven význam Glu 600, lokalizovaného uvnitř póru iontového kanálu, jakožto aktivní místo pro potenciaci aktivity TRPV1 protony. Zatímco Glu 648 je zahrnut do procesu přímé aktivace TRPV1 (Jordt, Tominaga et al. 2000). Tyto mechanicky rozdílné účinky protonů naznačují existenci na podnětu závislých specifických kroků během aktivačního procesu TRPV1. Protony, kromě schopnosti aktivovat TRPV1 nebo modulovat jeho aktivitu, také procházejí neselektivním TRPV1 pórem v kyselém extracelulárním prostředí. Tento fenomén potvrzuje aktivní proudění protonů kanálovým pórem spolu s vodou (Hellwig, Plant et al. 2004).

2.3.2.3 Aktivace teplem

Elektrofyzilogické studie prokázaly že, elektrické proudy TRPV1, které byly vyvolané teplem, vykazují podobné vlastnosti jako proudy vyvolané účinkem kapsaicinu. Ačkoliv je zde několik rozdílných vlastností jako rozdílný poměr propustnosti pro kationty a Ca^{2+} nezávislá desenzitizace, potvrzuje se, že TRPV1 receptorem zprostředkované odpovědi na kapsaicin a teplo zahrnují rozdílné, ale vzájemně se překrývající mechanismy (Tominaga and Tominaga 2005). Teplem vyvolané otevření kanálu dokazuje funkci TRPV1 jako teplotního čidla. Bylo prokázáno, že se TRPV1 podílí na regulaci tělesné teploty (Caterina, Leffler et al. 2000; Davis, Gray et al. 2000; Gavva, Bannon et al. 2007), není však nezbytný pro vnímání bolestivých teplot. Přestože není zcela jasné jak nebo na co teplo působí při otevření TRPV1 kanálu, je dnes již známo, že některé iontové kanály TRP rodiny jsou termosenzitivní (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8, TRPA), což dokazuje, že jsou na těchto kanálech přítomny teplotně citlivé domény (Jordt, McKemy et al. 2003; Patapoutian, Peier et al. 2003; Tominaga and Caterina 2004). Strukturálně-funkční studie prokázaly, že teplotní práh je regulován především distální částí C- konce TRPV1 (Prescott and Julius 2003; Vlachová, Teisinger et al. 2003). Ten může být nevratně snížen vlivem částečné denaturace, je-li protein vystaven teplotám přesahujícím 53 °C (Lyfenko, Vlachová et al. 2002). Určité mutace a fosforylace proteinkinasou A (PKA) nebo proteinkinasou C (PKC) vedou ke snížení teplotní hranice pro aktivaci TRPV1 (Jordt, Tominaga et al. 2000; Tominaga, Wada et al. 2001;

Numazaki, Tominaga et al. 2002). To potvrzuje komplexnější vliv tepla na TRPV1. Tato hypotéza může být potvrzena i skutečností že doposud nebyly popsány žádné mutace, které selektivně odstraní aktivaci kanálu teplem. TRPV1 je znám jako napěťově otevíraný kanál. Nedávná publikace úzce propojila teplotní citlivost TRPV1 a TRPM8 s napěťově závislým otevíráním (Voets, Droogmans et al. 2004). TRPV1 je aktivován při depolarizaci a při změnách teploty. S využitím matematického modelování zkonstruoval Nilius a kol. termodynamický model, který demonstruje změny teploty, které mohou vysvětlit teplotní citlivost obou kanálů. Potvrzuje tedy, že aminokyseliny podílející se na napěťové závislosti jsou i termosenzitivní, ačkoliv čtvrtá transmembránová doména TRPV1 postrádá mnohočetná pozitivně nabitá aminokyselinová rezidua, což je typickým znakem napěťově otevíraných kanálů.

2.3.2.4 Desenzitizace

Kapsaicin nezpůsobuje pouze bolest, ale zdá se mít i analgetické účinky, a to především při léčbě bolesti spojené s diabetickou neuropatií nebo revmatoidní artritidou (Tominaga, Wada et al. 2001). Tento paradoxní účinek může souviset se schopností kapsaicinu po dlouhodobé expozici, desenzitizovat zakončení nociceptorů vůči kapsaicinu, ale i vůči dalším bolestivým podnětům. Na molekulární úrovni může být toto snížení odpovědi TRPV1 po kontinuální expozici vaniloidům spojeno s předcházející desenzitizací závislé na extracelulárním hladině Ca^{2+} (Caterina, Schumacher et al. 1997; Szallasi and Blumberg 1999). Nicméně zde může hrát roli i fyzikální destrukce nervových zakončení.

Desenzitizace vůči kapsaicinu je složitý proces s proměnlivými kinetickými složkami: rychlá fáze se zdá být závislá na proniknutí Ca^{2+} pórem iontového kanálu TRPV1 (Docherty, Yeats et al. 1996; Liu and Simon 1996; Koplas, Rosenberg et al. 1997; Piper, Yeats et al. 1999) a pomalá fáze nezávislá na Ca^{2+} . Inhibitor kalcineurin snižuje desenzitizaci TRPV1 (pomalá komponenta), což naznačuje, že zde hraje roli Ca^{2+} závislá fosforylace/defosforylace (Docherty, Yeats et al. 1996). Mimo to může být pomalá fáze desenzitizace zprostředkována i fosforylací PKA (Bhave, Zhu et al. 2002). Po expozici kapsaicinu bývá TRPV1 defosforylován. Ser 116 na N- konci je substrátem

pro PKA-závislou fosforylaci. Dalším reziduem, které se může podílet na PKA závislé desenzitizaci je Thr 370 (Mohapatra, Wang et al. 2003).

Na Ca^{2+} závislé desenzitizaci TRPV1 se podílí také kalmodulin (CaM) (Numazaki, Tominaga et al. 2003). Již dříve bylo publikováno, že kalmodulin může pravděpodobně interagovat s 35 aminokyselinovým segmentem na C- konci TRPV1 (767-801) (Numazaki, Tominaga et al. 2003). Naše studie identifikovala aminokyselinová rezidua, která jsou pro vazbu kalmodulinu (CaM) na C- konci TRPV1 významná. Mutace Arg 785 Ala zcela tuto vazbu inhibovala, nicméně významně se na této vazbě podílejí i další bazické aminokyseliny Arg 771, Lys788 a Arg 797 a překvapivě pouze jediný hydrofobní aminokyselinový zbytek Val 769. (Gryčová, Lánský et al. 2008). Přerušení oblasti vazebného místa pro kalmodulin, předchází desenzitizaci TRPV1 závislé na extracelulárním Ca^{2+} po krátkodobé aplikaci kapsaicinu. Ačkoliv na buňkách exprimující mutanty je po dlouhodobějším působení kapsaicinu stále pozorován určitý stupeň desenzitizace. Oblast první ankyrinové domény na N- konci (aminokyseliny 189-222), byla také označena za vazebné místo pro kalmodulin, která se také podílí na desenzitizaci (Rosenbaum, Gordon-Shaag et al. 2004). Zda do procesu desenzitizace, závislé na Ca^{2+} zprostředkované CaM, je více zapojen N- konec nebo C- konec není doposud známo. Zajímavé je, že analýzou primární sekvence zde nebyla identifikována doména obsahující vazebné místo pro CaM ani konsensuálně určený motiv Ile-Gln. Desenzitizace závislá na Ca^{2+} je celkem běžným rysem mnoha kationtových kanálů včetně nukleotidy otevíraných kanálů (Molday 1996) a L-typu Ca^{2+} kanálů (Peterson, DeMaria et al. 1999; Zuhlke, Pitt et al. 1999). Tato vlastnost může představovat fyziologický bezpečnostní mechanismus proti nebezpečnému předávkování buňky kalcium, především během masivního proudění Ca^{2+} kanálem. Je nutné podotknout, že existují také na Ca^{2+} nezávislé formy desenzitizace TRPV1. Je to desenzitizace zapříčiněná kontinuální nebo opakovanou tepelnou expozicí, která je pozorována dokonce za nepřítomnosti Ca^{2+} (Tominaga, Caterina et al. 1998). Tato reakce vyúsťuje také ve zkříženou desenzitizaci vůči kapsaicinu. Strukturální základy desenzitizace nebyly doposud objasněny.

2.3.2.5 Permeabilita

Doposud nebyla přesně identifikována oblast, která je důležitá pro propustnost pro kationty. Asp 646 má vliv na afinitu k ligandům (Welch, Simon et al. 2000), jeho záměnou za Asn vzroste desetkrát účinnost blokátoru ruthenia red a čtyřikrát vzhledem k Na^+ poklesne relativní permeabilita pro dvojmocné kationty Mg^{2+} bez ovlivnění selektivity jednomocných kationtů (Garcia-Martinez, Morenilla-Palao et al. 2000). Předpokládá se, že změna propustnosti pro Ca^{2+} ovlivní Ca^{2+} závislou desenzitizaci (Tominaga and Tominaga 2005). Mutanty TRPV1 se zaměněným Tyr 671 za Lys v oblasti šesté transmembránové domény mají mnohonásobně nižší propustnost pro Ca^{2+} , což vede k úplné ztrátě desenzitizace za přítomnosti extracelulárního Ca^{2+} (Mohapatra, Wang et al. 2003).

2.3.2.6 Senzitizace TRPV1

Dalším důležitým aspektem regulace TRPV1, který se následně dostal do popředí zájmu byl mechanismus, kterým zánětlivé mediátory z poškozených tkání zvyšují citlivost TRPV1 vůči svým chemickým a fyzikálním podnětům. Zatímco protony působí přímo na TRPV1 kanál, ostatní podněty ovlivňují kanál nepřímo, například přes vlastní tyrosinkinasovu aktivitu, přes receptory spojené s G-proteiny. Nedávno byl také zmíněn význam ATP v souvislosti s modulací aktivity TRPV1 (Kwak, Wang et al. 2000). Stejně jako ostatní iontové kanály TRPV1 může být fosforylován kinasami, jako jsou PKA (De Petrocellis, Harrison et al. 2001; Bhave, Zhu et al. 2002; Hu, Bhave et al. 2002; Rathee, Distler et al. 2002), PKC (Tominaga, Wada et al. 2001; Sugiura, Tominaga et al. 2002; Bhave, Hu et al. 2003; Dai, Moriyama et al. 2004; Premkumar, Qi et al. 2004), Ca^{2+} /CaM – dependentní kinasou II (CaMKII) (Jung, Shin et al. 2004) nebo Src kinasa (Jin, Morsy et al. 2004).

2.3.2.7 Fosforylace proteinkinasou A

Rozsáhlé práce ukázaly že aktivace PKA-dependentní cesty zánětlivými mediátory jako jsou prostaglandiny má vliv na kapsaicinem a teplem zprostředkované činnosti v senzoričských neuronech, pravděpodobně působením na TRPV1. Tyto výsledky potvrzují, že PKA hraje vedoucí úlohu ve vzniku hyperalgesie a zánětu způsobené zánětlivými mediátory. Ser 116 a Thr370 lokalizované na N- konci, jsou údajně fosforylovány PKA a ovlivňují desenzitizaci (Bhave, Zhu et al. 2002; Mohapatra, Wang et al. 2003). Fosforylace Ser 116 PKA inhibuje defosforylaci TRPV1 způsobenou expozicí kapsaicinu. Thr 144, Thr 370 a Ser 502 jsou také zapojeny do odpovědi teplem senzitivovaných TRPV1 receptorů v závislosti na PKA fosforylaci (Rathee, Distler et al. 2002).

2.3.2.8 Fosforylace proteinkinasou C

Po aktivaci receptorů spojených s Gq-proteiny některými zánětlivými mediátory, ATP, bradykininem, prostaglandiny, trypsinem nebo tryptasou, dochází PKC-dependentní fosforylaci TRPV1 (Tominaga, Wada et al. 2001; Sugiura, Tominaga et al. 2002; Moriyama, Iida et al. 2003; Dai, Moriyama et al. 2004; Moriyama, Higashi et al. 2005). PKC dependentní fosforylace TRPV1 zvyšuje odpověď po podání kapsaicinu nebo odpověď na expozici protonům, ale také snižuje teplotní hranici pro aktivaci TRPV1. Dochází tedy k aktivaci TRPV1 za teplot, které jsou za normálních podmínek nebolestivé v rozsahu tělesné teploty a vyvolávají pocit bolesti. Tento fenomén byl také potvrzen u nativních senzoričských neuronů. PKC dependentní fosforylace moduluje účinnost kapsaicinu, to potvrzuje souvislost mezi fosforylaci a vazbou kapsaicinu, která již byla popsána výše. S využitím biochemických metod, byly identifikovány dva cílové Ser aminokyselinové zbytky (Ser 502 a Ser 800) (Numazaki, Tominaga et al. 2002; Bhave, Hu et al. 2003), které jsou přímo fosforylovány PKC. U mutant kde byly dva aminokyselinové zbytky Ser nahrazeny za Ala, nedocházelo k senzitivaci a zvyšování aktivity TRPV1 po indukci jedním ze tří různých podnětů (kapsaicin, pH nebo teplo). Aminokyselinové zbytky Ser 502 a Ser 800 mají vliv na zvyšování aktivity TRPV1 indukované NADA (Premkumar, Qi et al. 2004) a oleylethanolamidem (OEA)

(Ahern 2003), dále také ovlivňují refosforylaci po Ca^{2+} dependentní desenzitizaci (Mandadi, Numazaki et al. 2004).

2.3.2.9 Fosforylace kalmodulinkinasou II

Jak již bylo popsáno výše, calcineurin inhibuje desenzitizaci TRPV1, což naznačuje, že proces fosforylace a defosforylace je významný pro aktivitu TRPV1. CaMKII skutečně ovlivňuje aktivitu TRPV1, reguluje vazbu kapsaicinu a tím i fosforylaci TRPV1 na Ser 502 a Thr 704 (Jung, Shin et al. 2004). Zdá se tedy, že fosforylace třemi různými typy kinas reguluje aktivitu TRPV1. Ser 502, který byl označen za fosforylační místo pro všechny tři kinasy, pravděpodobně představuje klíčové místo regulace excitace sensorických neuronů.

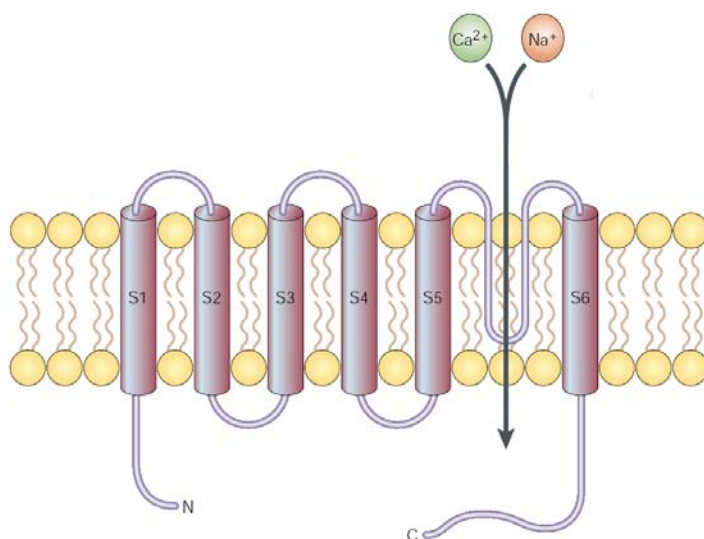
2.3.2.10 Modulace lipidy

Lipidy derivované membránou regulují některé iontové kanály. TRPV1 je aktivován anandamidem, OEA a některými produkty lipoxygenas. TRPM7 a s G-proteiny spojený směrem do buňky usměrňující K kanál, mohou být inhibovány nebo potencovány vazbou fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfátu (PIP_2) (Zygmunt, Petersson et al. 1999; Hwang, Cho et al. 2000; Ahern 2003). PIP_2 přirozeně asociuje s TRPV1, způsobuje tím inhibici kanálu. Inhibice způsobená PIP_2 může být uvolněna metabotropním receptorem, který byl aktivován phospholipasou C (PLC). Následně dochází k hydrolyze PIP_2 na diacylglycerol a inositol (1,4,5) fosfát. K obnovení aktivity kanálů dochází po štěpení PIP_2 fosfolipasou C nebo experimentálním odstraněním PIP_2 specifickými protilátkami. Na regulaci TRPV1 molekulou PIP_2 se podílí oblast pozitivně nabitých aminokyselin (777 – 820), pravděpodobně díky interakci s negativně nabitou částí fosfolipidů (Prescott and Julius 2003). Při experimentech, ve kterých bylo domnělé vazebné místo pro PIP_2 na TRPV1 nahrazeno vysokoafinitní vazebnou doménou z směrem do buňky usměrňujícího K^+ kanálu došlo k posunu teplotní hranice pro aktivaci TRPV1 směrem k vyšším teplotám (Prescott and Julius 2003). Zajímavé je, že tato oblast zahrnuje i Ser 800, který plní funkci substrátu při fosforylaci PKC a

zároveň se překrývá s 35 aminokyselin dlouhou sekvencí nutnou pro vazbu CaM. Z těchto důvodů, by mohla být tato oblast významná pro regulaci TRPV1.

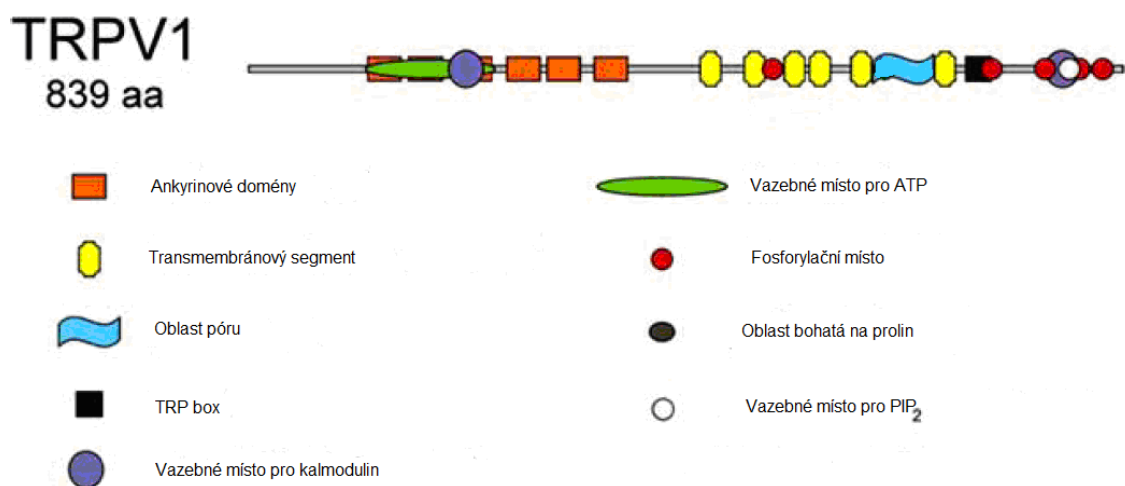
2.3.3 Struktura TRPV1

TRPV1 je tvořen sekvencí 838-aminokyselinových zbytků o celkové molekulové hmotnosti 95kDa. Stejně jako ostatní členové podrodiny TRPV, je TRPV1 integrální membránový kanál. Předpokládaná transmembránová oblast (433–684) je tvořena šesti helixy. Mezi pátou a šestou transmembránovou doménou ohraničuje krátká hydrofobní smyčka oblast póru. N- a C- konce jsou orientovány intracelulárně (obr. 2) (Caterina, Schumacher et al. 1997). Kapsaicinové receptory vytvářejí obdobně jako řada dalších strukturně příbuzných iontových kanálů (Higgins, Weitz et al. 2002; Sokolova, Accardi et al. 2003; Sokolova 2004; Chiu, Pagel et al. 2007) tetramerický kanál (Moiseenkova-Bell, Stanciu et al. 2008). Analýzou oligomerického uspořádání, bylo zjištěno že TRPV1 tvoří buď homomultimery bez přítomnosti další podjednotky, nebo že inkorporace jiné než TRPV1 podjednotky nemá vliv na jeho funkci. (Kedei, Szabo et al. 2001; Rutter, Ma et al. 2005).



Obr. 2. Obrázek předpokládané struktury TRPV1, 6 transmembránových domén S1 – S6, mezi S5 a S6 je znázorněna krátká hydrofobní smyčka ohraničující oblast póru. N- a C- konce jsou orientovány intracelulárně. (převzato z (Clapham, Runnels et al. 2001)).

Oblast cytoplazmatických konců zaujímá větší část molekulové hmotnosti tohoto kanálu (cca 70 %). Strukturně funkční studie prokázaly, že intracelulární oblast je významným místem kontaktu mnoha vazebných partnerů TRPV1 (Vennekens, Owsianik et al. 2008) (obr. 3).



Obr. 3. Předpokládaná topologie jednotlivých vazebných míst TRPV1 (Vennekens, Owsianik et al. 2008).

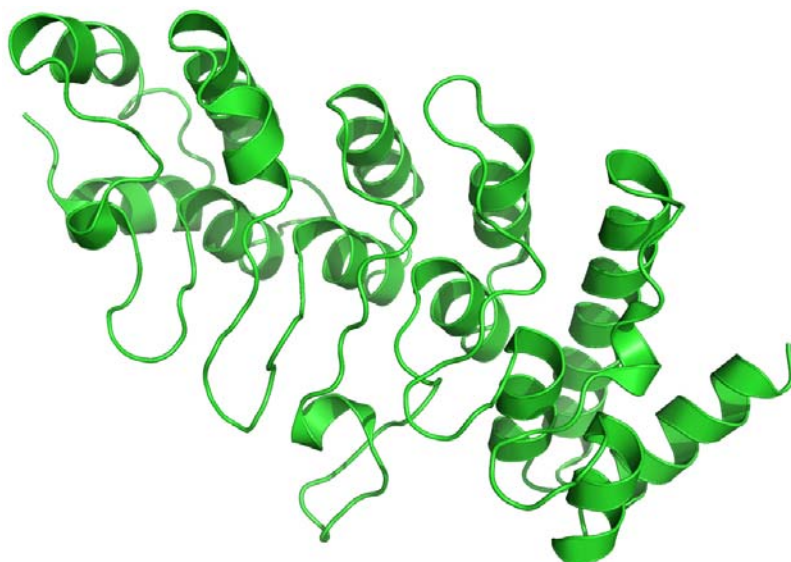
Nedávno byla vyřešena terciární struktura celé sekvence TRPV1 s využitím metody elektronové mikroskopie s rozlišením 19 Å (Moiseenkova-Bell, Stanciu et al. 2008). Byla potvrzena výše zmiňovaná tetramerní struktura. Nicméně toto rozlišení je pro bližší charakterizaci tohoto kanálu nedostatečné. Pro získání detailnějších strukturních informací byla již dříve využita metoda homologního počítačového modelování ať už pouze pro modely izolovaného C- konce (Vlachová, Teisinger et al. 2003; Garcia-Sanz, Fernandez-Carvajal et al. 2004; Gryčová, Lánský et al. 2007), topologie membránových helixů (Long, Campbell et al. 2005), popřípadě jejich interakce s ligandy (Gavva, Klionsky et al. 2004; Gryčová, Lánský et al. 2008), nebo na úrovni celého iontového kanálu (Brauchi, Orta et al. 2007; Fernandez-Ballester and Ferrer-Montiel 2008).

Tyto homologní modely byly získány na základě sekvenční podobnosti s již vyřešenými strukturami jako je kanál otevíraný cyklickými nukleotidy (cyclic nucleotide-gated channel HCN2) (Zagotta, Olivier et al. 2003), napětově otevíraný

draselný kanál (voltage-dependent Shaker family K^+ channel) (Long, Campbell et al. 2005), draselný kanál Kv 1.2 (Long, Tao et al. 2007), nebo v případě izolovaného C- konce, protein fragilní histidinové triady (Fragile Histidine Triad Protein, FHIT) (Lima, D'Amico et al. 1997). Oblast N- terminální domény N- konce byla modelována dle lidské thimidilátkinasy (Ostermann, Lavie et al. 2000). Tato sekvenční podobnost vedla k předpokladu, že TRPV1 může zaujímat s největší pravděpodobností i podobnou 3D konformaci.

2.3.3.1 Cytoplazmatický N- konec TRPV1

N- konec je tvořen 400 aminokyselinovými zbytky. Obdobně jako i další členové TRPV rodiny, obsahuje oblasti bohaté na prolin a šest ankyrinových domén (Jin, Touhey et al. 2006; McCleverty, Koesema et al. 2006), které jsou z funkčního hlediska považovány za esenciální (Jung, Lee et al. 2002; Hellwig, Albrecht et al. 2005). Ankyrinové domény jsou tvořeny sekvenčním motivem 33 aminokyselinových zbytků a podílejí se často na protein-proteinových interakcích. Oblast ankyrinových domén u TRPV1 kanálu je známa svou schopností vázat kalmodulin a zároveň je i vazebným místem pro ATP (Lishko, Procko et al. 2007). Oblast ankyrinových domén (101–364) byla zatím jako jediný úsek TRPV1 receptoru detailněji strukturně vyřešena (pdb kód 2PNN) (Lishko, Procko et al. 2007) (Obr.4).



Obr.4. Krystalová struktura ankyrinových domén na N- konci TRPV1, získána s rozlišením 2,7Å (Lishko, Procko et al. 2007).

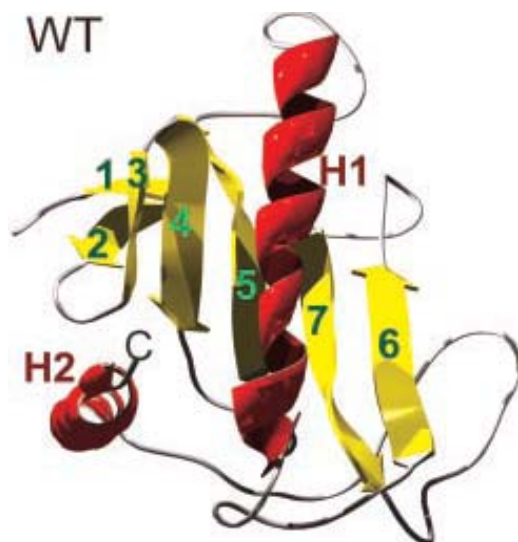
Každá z ankyrinových domén je tvořena dvěma antiparalelními α -helixy po nichž následuje smyčka tzv. „finger loop“. Právě tato oblast je častým místem kontaktu s vazebnými partnery i u dalších iontových kanálů (Sedgwick and Smerdon 1999; Mosavi, Cammett et al. 2004).

2.3.3.2 Cytoplazmatický C- konec TRPV1

Kratší C- konec je tvořen 154 aminokyselinami a obsahuje TRP doménu v blízkosti šestého transmembránového segmentu. Dále zde bylo identifikováno vazebné místo pro ATP (Kwak, Wang et al. 2000; Numazaki, Tominaga et al. 2003; Gryčová, Lánský et al. 2007) a vazebné místo pro kalmodulin (Numazaki, Tominaga et al. 2003; Gryčová, Lánský et al. 2008). Detailnější experimentálně ověřené strukturní informace o C-konci TRPV1 nebyly doposud publikovány.

Homologní modelování ve spojení s dalšími metodami bylo využito pro získání dalších poznatků o vlastnostech C- konce TRPV1 a jeho interakcích s jednotlivými ligandy. Dle modelu získaného na základě podobnosti s proteinem fragilní histidinové triady, jejíž struktura byla vyřešena s rozlišením 1,85Å (Lima, D'Amico et al. 1997) se

předpokládá, že C- konec TRPV1 je tvořen dvěma α -helixy a pěti β -listy. (Vlachová, Teisinger et al. 2003; Gryčová, Lánský et al. 2007) (obr 5).



Obr. 5. Předpokládaná struktura C- konce TRPV1 Ala 690 – Lys 838. Žlutou barvou jsou znázorněny β -listy (1-7) a červeně α -helixy (H1 a H2). Obrázek je převzat z práce (Vlachová, Teisinger et al. 2003).

Vazebné místo pro ATP - Jak již bylo výše zmíněno na C- konci TRPV1 se nachází vazebné místo pro ATP. Sekvenční analýzou bylo potvrzeno, že se jedná o nukleotid vazebnou doménu (NBD - nucleotide binding domain) typu Walker A (Kwak, Wang et al. 2000).

Walker A motiv - Tzv. Walker A motiv představuje ATP vazebné místo tvořené sekvencí aminokyselin bohatou na glycin (Walker, Saraste et al. 1982). V minulost již bylo uvedeno několik variací tohoto motivu: GXXGXGK (Walker, Saraste et al. 1982), GXXXXGK (Driscoll, Komatsu et al. 1995), GXXGXXK (Sathishchandran, Hickman et al. 1992) přítomných na množství proteinů. Do této skupiny patří i bakteriální ABC transportéry. Neměnná pozice lysinu, naznačuje jeho význam jakožto potenciálního místa přímého kontaktu s γ fosfátem ATP (Story, Weber et al. 1992; Wiese, Hinz et al. 2006).

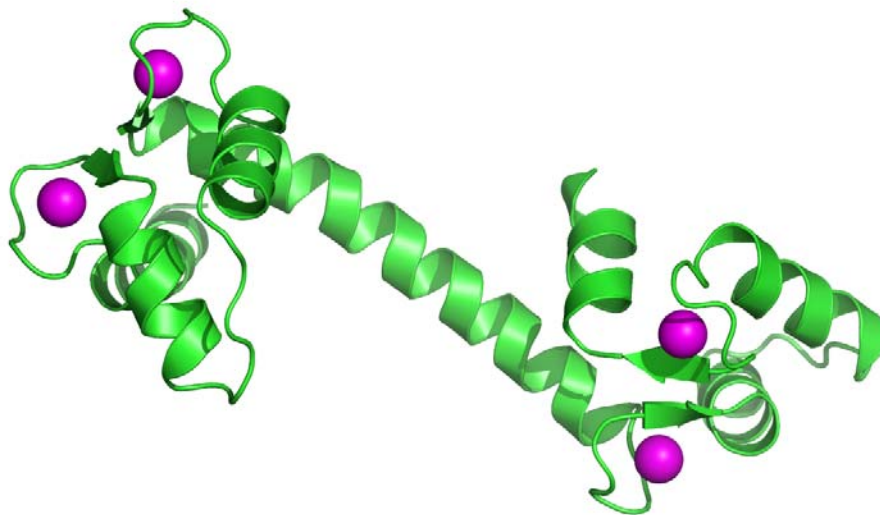
Krystalové struktury několika členů rodiny bakteriálních ABC transportérů (Dean, Rzhetsky et al. 2001; Ambudkar, Kim et al. 2006) byly použity jako templát pro

modelování 3D struktury Walker A motivu na C- konci TRPV1 (Gryčová, Lánský et al. 2007).

Vazebné místo pro kalmodulin - Kalmodulin se významně podílí také na regulaci TRPV1 receptoru. Jak již bylo zmíněno výše, tento receptor interaguje s kalmodulinem i prostřednictvím vazebného místa lokalizovaných na cytoplazmatickém C- konci (Numazaki, Tominaga et al. 2003; Lishko, Procko et al. 2007).

Kalmodulin je ubikvitární, 16,7 kDa velký, Ca^{2+} vazebný protein, který je tvořen 148 aminokyselinovými zbytky (Babu, Sack et al. 1985; Ikura, Clore et al. 1992; Nakayama and Kretsinger 1994; Zhang, Tanaka et al. 1995). Tomuto proteinu je věnován velký zájem zejména díky jeho vztahu k fyziologicky významným buněčným procesům. Jako jsou kalcium dependentní signální řady, regulace aktivity množství iontových kanálů, iontových pump a proteinkinas. Kalmodulin svojí schopností interagovat s více než 40 proteiny a enzymy plní funkci důležitého spojovacího prvku signálu intracelulárního Ca^{2+} a následných buněčných procesů.

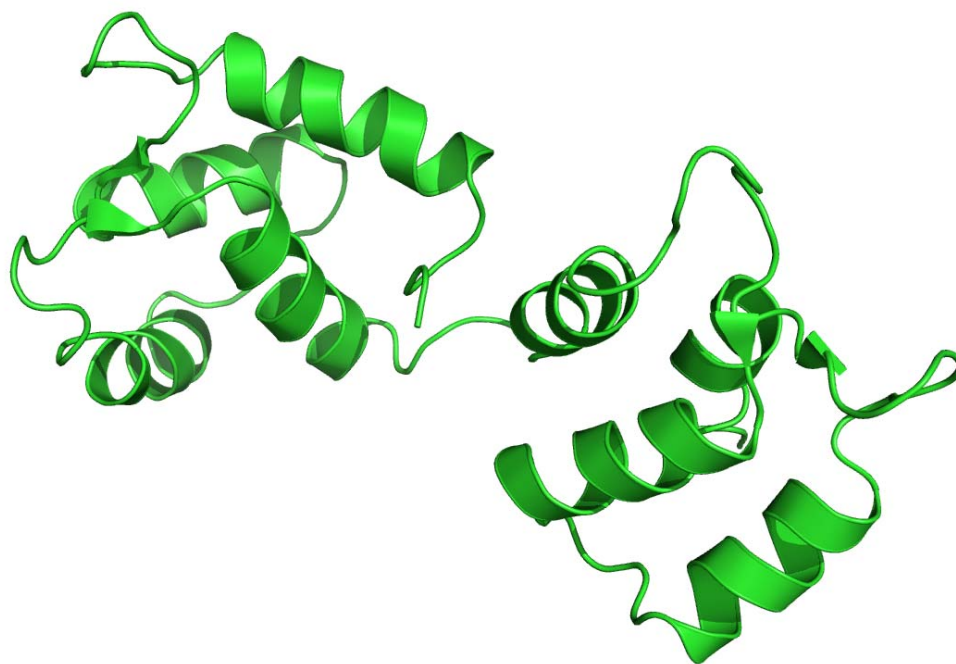
Krystalografickými technikami bylo ukázáno, že Ca^{2+} -kalmodulin zaujímá konformaci, která připomíná tvar činky (Babu, Sack et al. 1985; Babu, Bugg et al. 1988). C- a N- terminální domény jsou odděleny α – helikální spojkou tzv. „linkerem“, často označovaným za centrální helix, tvořeným 27 aminokyselinovými zbytky. C- a N-terminální domény vykazují vysoký stupeň homologie (46% identity), jsou tvořeny dvěma tzv. „EF hand“ kalcium vazebnými helix-smyčka-helix motivy (Kretsinger and Nockolds 1973), které jsou spojeny antiparalelním β listem (obr. 6).



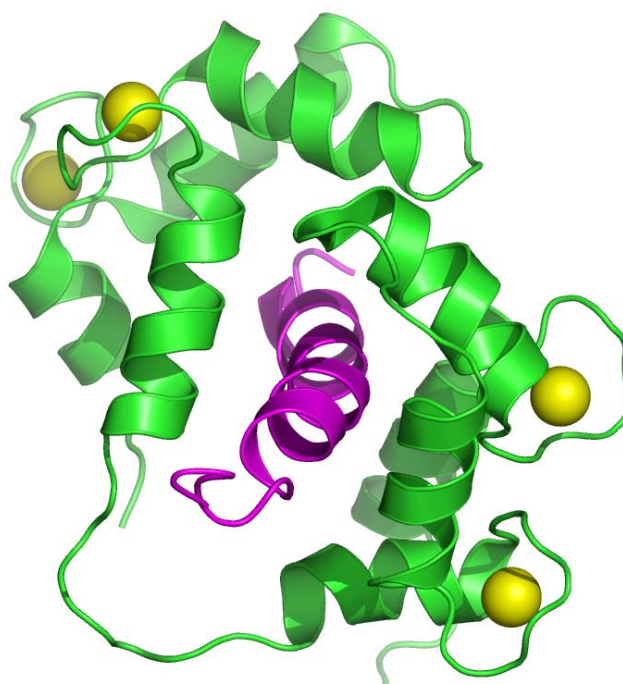
Obr. 6. Krystalová struktura kalmodulinu (zobrazen zeleně) s navázanými kalciovými ionty (zobrazeny fialově), PDB kód 3CLN (Babu, Bugg et al. 1988).

Kalmodulin v nepřítomnosti Ca^{2+} bývá označován také jako apokalmodulin, α – helixy tvořící EF hand motiv jsou orientované téměř paralelně tzv. otevřená konformace (Obr. 7). V souvislosti s vazbou Ca^{2+} dochází k výrazným konformačním změnám. Ca^{2+} ionty se vážou do oblasti smyčky EF hand motivu a mění její pozici vzhledem k α - helixu (Yap, Ames et al. 1999). Centrální helix si ponechává v roztoku značnou flexibilitu (Barbato, Ikura et al. 1992). Tyto změny konformace zvyšují vazebnou afinitu k řadě cílových proteinů (Gerstein and Krebs 1998).

Množství strukturních studií kalmodulinu a cílového proteinu prokázalo, že kalmodulin vytváří kompaktní globulární strukturu, která vzniká ohnutím centrálního helixu. Vazebný partner ve většině případů zaujímá α - helikální strukturu, která bývá zpravidla uvnitř jakéhosi vazebného tunelu, který vzniká změnou konformace kalmodulinu (Ikura, Clore et al. 1992; Meador, Means et al. 1993) (obr. 8).

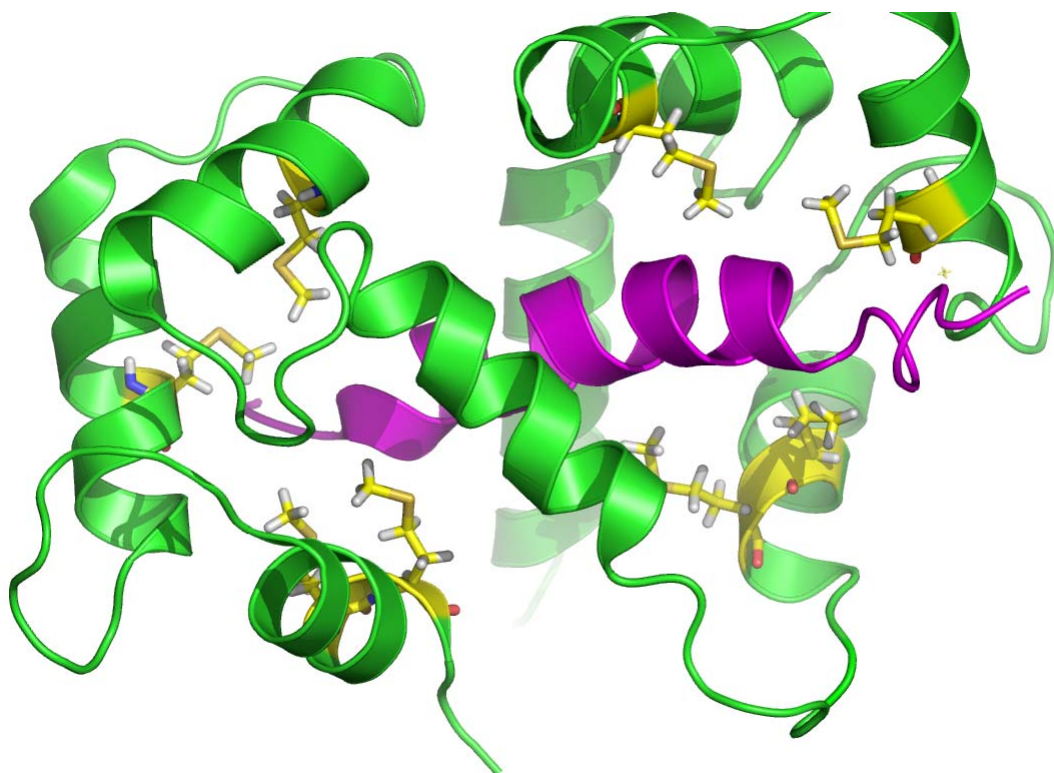


Obr. 7. NMR struktura kalmodulinu bez Ca^{2+} iontů, PDB kód 1DMO (Zhang, Tanaka et al. 1995).



Obr. 8. NMR struktura Ca^{2+} -kalmodulinu (zobrazen zelenou barvou) v komplexu s peptidem kinasy lehkého řetězce myosinu (MLCK) (zobrazen fialovou barvou). Kalciové ionty jsou zobrazeny žlutě, PDB kód 2BBM (Ikura, Barbato et al. 1992).

Předpokládá se, že kalmodulin interaguje s množstvím ligandů díky vysokému podílu methioninových reziduí (9 ze 148). Dosud vyřešené struktury kalmodulin vazebných peptidů ať už metodou NMR nebo metodou rentgenové krystalografie tento předpoklad potvrzují. 8 z 9 methioninových zbytků se vazby přímo účastní (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>) (obr. 9).



Obr. 9. Žlutou barvou jsou zobrazeny postranní řetězce Met reziduí kalmodulinu, které se účastní vazby na peptid MLCK. Peptid vázající se na kalmodulin je zobrazen fialovou barvou a Ca^{2+} - kalmodulin zelenou barvou.

Kalmodulin vazebné motivy

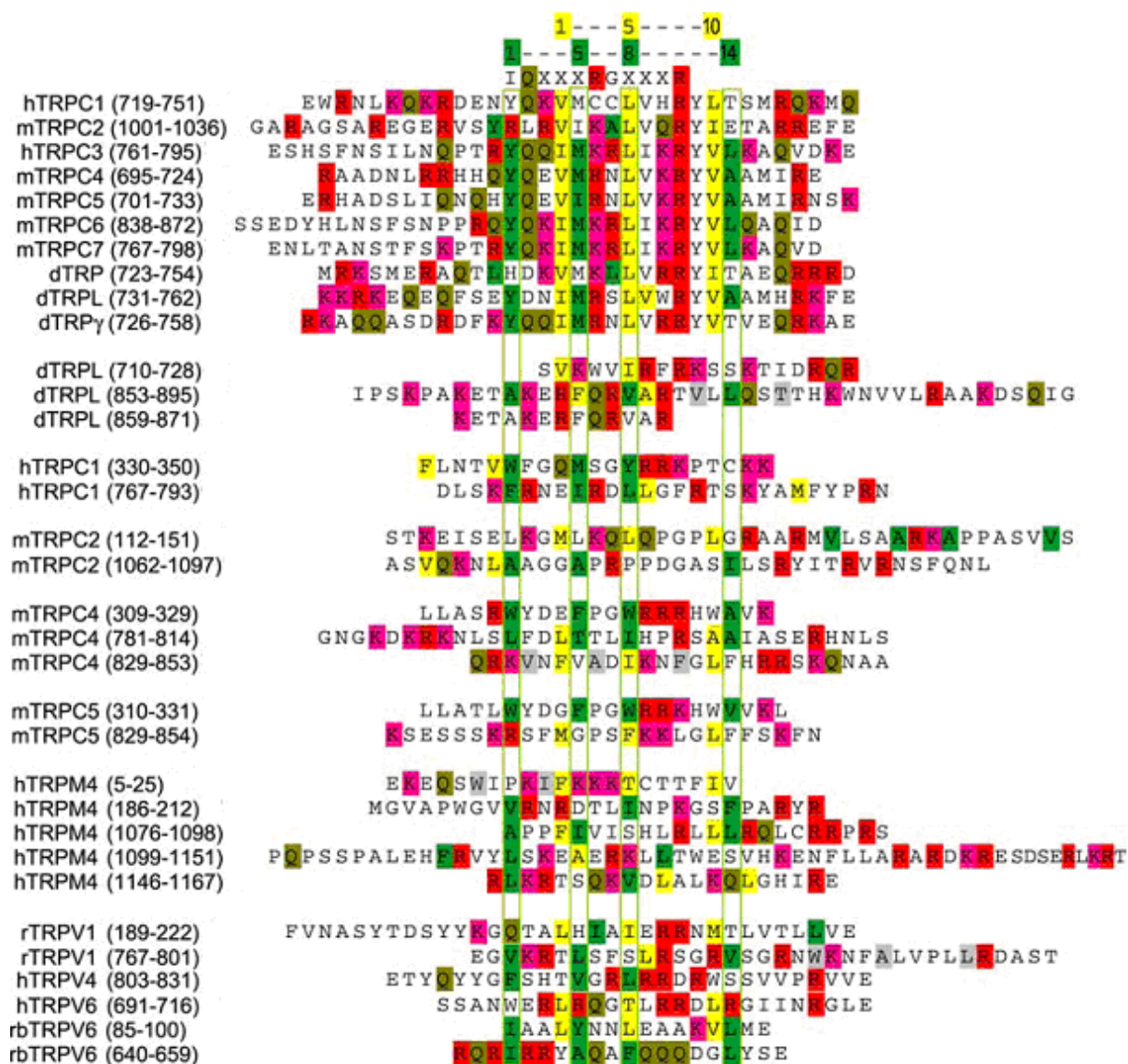
Díky své konformační flexibilitě se může kalmodulin vázat na množství proteinů, které nevykazují žádnou příbuznost. Oblast vazebného místa pro kalmodulin na cílových proteinech se však často vyskytuje poblíže i) pseudosubstrátových vazebných domén například pro proteinkinasy a protein fosfatasy, ii) fosforylačních míst pro serin/threonin proteinkinasy, iii) vazebných míst dalších proteinů (Rhoads and

Friedberg 1997). Funkční nejednotnost vazebných domén částečně vysvětluje i značnou sekvenční diversitu těchto oblastí. Nicméně na většině těchto kalmodulin vazebných proteinů se nachází oblast v rozsahu kolem dvaceti aminokyselinových zbytků vytvářející bazický helix (Persechini and Kretsinger 1988; O'Neil and DeGrado 1990) a je tvořena pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky obklopující hydrofobní rezidua (Ikura 1996).

Analýzou sekvenční homologie bylo však identifikováno několik strukturních a sekvenčních rysů, které dovolují vytvořit určitou klasifikaci kalmodulin vazebných motivů. První skupinu tvoří proteiny nesoucí vazebnou doménu pro kalmodulin a interagující nezávisle na Ca^{2+} iontech (Geiser, van Tuinen et al. 1991). Pro tyto proteiny je typický tzv. IQ motiv (Cheney and Mooseker 1992). Tento motiv je obvykle tvořen sekvencí 25 aminokyselinových zbytků, jehož jádro je tvořeno IQXXXRGXXXR (X značí libovolný aminokyselinový zbytek).

Členy druhé skupiny kalmodulin vazebných proteinů tvoří zástupci interagující s kalmodulinem v závislosti na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Dle Calmodulin Target Database (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>) je možné provést následující členění: 1-5-10, 1-8-14 a 1-16 motivy, což odpovídá i již dříve publikované klasifikaci (Rhoads and Friedberg 1997). Kde číslo značí pozici hydrofobního aminokyselinového zbytku. Tato klíčová rezidua bývají zpravidla obklopena pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky.

Nedávno provedl Zhu et al. (Zhu 2005) porovnání kalmodulin vazebných domén mezi členy rodiny iontových kanálů TRP (obr. 10). V sekvenci každé kalmodulin vazebné domény je možné identifikovat alespoň jeden z konsenzuálně určených motivů. V případě TRPC 3 – 7 je možné detekovat dokonce tři různé motivy. Mezi členy TRP rodiny iontových kanálů byly zaznamenány i různé variace na tyto klasické motivy, kdy jeden z předpokládaných klíčových hydrofobních aminokyselinových zbytků byl nahrazen Gln, Gly, Pro, Ser nebo Thr, což naznačuje že tyto kalmodulin vazebné domény mohou být atypické (Zhu 2005). Model vazebného místa pro kalmodulin na C- konci TRPV1 byl vytvořen dle homologní vazebné domény templátové struktury kinasy lehkého řetězce myosinu (myosin light chain kinase - MLCK) (Ikura, Barbato et al. 1992).



Obr. 10. Kalmodulin vazebné sekvence identifikované u členů TRP rodiny iontových kanálů různých živočišných druhů (h – lidský, d- drosophila, m – myš, r- potkan, rb- králík), Arg, Lys a Gln zbytky jsou vyznačeny červeně, růžově a zeleně. Obrázek je převzat z práce Zhu et al.(Zhu 2005).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem předložené doktorské práce bylo detailněji charakterizovat interakce izolovaného C- konce vaniloidního receptoru TRPV1 s jeho vazebnými partnery a pokusit se je osvětlit i ze strukturního hlediska pomocí predikce homologních počítačových modelů.

Tato práce se zabývá těmito konkrétními otázkami:

1. Identifikace esenciální části Walker A vazebné domény C- konce TRPV1 pro vazbu ATP na C- konec TRPV1.
2. Určení specifických aminokyselinových zbytků při vazbě ATP na izolovaném C- konci TRPV1 kanálu.
3. Charakterizace vazby C- konce TRPV1 a kalmodulinu.
4. Identifikace a lokalizace vazebného místa pro kalmodulin na izolovaném C- konci TRPV1

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Konstrukce expresních plazmidů

Všechny proteiny, které byly použity pro experimenty při studiu ATP vazebného místa byly exprimovány z plasmidu pGEX2t (Novagen), konstrukty použité při studiu kalmodulin vazebného místa byly exprimovány z expresního vektoru pET32b. Příslušné kódující sekvence byly amplifikovány metodou PCR (reakční cyklus: 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 25 cyklů) následně přečištěny, štěpeny enzymy EcoR I and Hind III pro vektor PET32b, XhoI v případě pGEX a vloženy do příslušných míst vektoru. Verifikace takto získaných konstruktů byla provedena sekvenčními metodami (ABI PRISM 3130xl DNA sekvenátor).

4.2 Bodové mutace pomocí polymerasové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Při metodě cílené mutagenese byly použity syntetické oligonukleotidy o délce 33 nukleotidů, které se oproti plazmidové DNA lišily v jedné až několika bazích:

Pro 732 Ala

gcaggtggggtcact**G**ctgacggcaaggatgac

Asp 733 Ala

ggtggggtcactcct**gC**cggaaggatgactac

Gly 734 Ala

ggggttcactcctgac**gC**caaggatgactaccgg

Lys 735 Ala

gttcactcctgacggcGCgatgactaccggtgg

Asp 736 Ala

cactcctgacggcaaggCtgactaccggtggtg

Asp 737 Ala

tcctgacggcaaggatgCctaccggtggtgttc

Val 769 Ala

ggcaactgtgagggcgCcaagcgaccctgagc

Arg 771 Ala

tgtgagggcgtaagCGcaccctgagcttctcc

Leu 777 Ala

ccctgagcttctccGcaaggccgagtttcaggg

Arg 778 Ala

ctgagcttctctcagCccgagtttcaggag

Arg 781 Ala

ctcctcaggccgagttGcaaggagaaactggaag

Val 782 Ala

ctcaggccgagtttcagCgagaaactggaagaac

Arg 785 Ala

gtttcagggagaaacGCgaagaactttgccctg

Lys 788 Ala

gaaactggaagaacGCtgccctgggtccc

Arg 797 Ala

ctggttcccctctgGCggatgcaagcaactcg

Při vlastních reakcích byl použit QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, USA). Při přípravě reakční směsi a reakčním protokolu bylo postupováno dle instrukcí výrobce:

Reakční směs:

5,0 µl Pfu ultra pufu

1,5 µl 10 mM dNTP

1,0 µl templátové DNA (10 ng/ µl)

1,0 µl „upstream“ oligonukleotidu (0,3 nM/ µl)

1,0 µl „downstream“ oligonukleotidu (0,3 nM/ µl)

1 µl polymerasy Pfu ultra

39,5 µl demineralizované vody

PCR program:

a) denaturace DNA 95 °C/ 1 min

vazba oligonukleotidů 45-55 °C/ 1 min

polymerace DNA 68 °C/ 12 min

b) opakování bodu a) 20×

c) polymerace DNA 68 °C/ 10 min

Aby byla po transformaci a izolaci DNA maximální pravděpodobnost získu mutované varianty, byla po proběhlé reakci odstraněna methylovaná templátová DNA, a to za pomoci restriční endonukleasy DpnI. Pro ověření přítomnosti žádané mutace bylo provedeno sekvenování (ABI PRISM 3130xl DNA sekvenátor).

4.3 Exprese a purifikace TRPV1-CT proteinů pro vazebné studie ATP

Pro studium vazby ATP na izolovaný TRPV1-CT (sekvence Val 686-Lys 837) byl C- konec TRPV1 produkován jako fúzní protein s glutathion S-transferasou. K produkci proteinu byl použit kmen bakterie *E. coli* BL21 (DE3). Bakterie byly kultivovány v 1 litru LB media při 37 °C. Po dosažení optické hustoty 0,8 byla narostlá kultura zchlazena na pokojovou teplotu a indukována exprese proteinu přidáním 0,5 mM IPTG, dále aerobně kultivována při teplotě 17 °C po dobu 20 hodin. Následně byla provedena centrifugace a pelet bakterií byl resuspendován v lyzačním pufru (1xPBS, 0,5 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,05 % Triton-X100). Resuspendovaný pelet byl zmrazen v -80 °C. Mechanické rozrušení buňek bylo provedeno na ledu sonikací. Sonikát byl centrifugován při 4 °C po dobu 45 minut/6000 g. Pro získání čistého TRPV1-CT byly použity chromatografické postupy, které zahrnují afinitní chromatografii (dle standardního protokolu pro glutathione Sepharose 4B - Amersham Biosciences) a gelovou filtraci provedenou na koloně Superdex 75 column (Amersham Pharmacia Biotech). Po prvním purifikačním kroku byl protein eluován pufrům 10 mM redukovaným glutathionem (Sigma) pH 8,0, frakce obsahující čistý TRPV1-CT protein byly spojeny a dialyzovány proti 1 l 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 10% Glycerol. Před druhým purifikačním krokem byl fúzní protein zkoncentrován za použití Millipore columns. Kontrola čistoty a přítomnosti proteinu v jednotlivých frakcích byla provedena na vertikální akrylamidové SDS elektroforese. Koncentrace proteinů byla určena měřením absorbance na 280 nm.

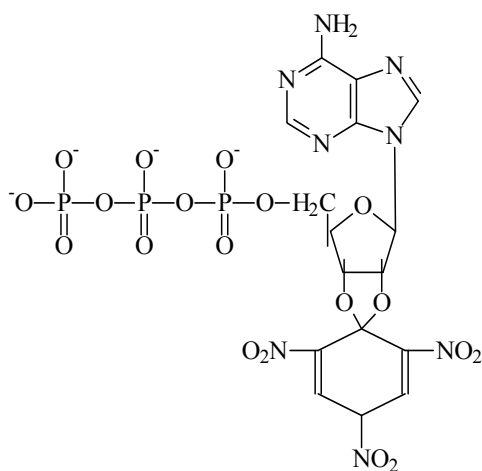
4.4 Exprese a purifikace TRPV1-CT proteinů pro vazebné studie kalmodulinu

Při studiu vazebného místa pro kalmodulin byl izolovaný C- konec TRPV1 exprimován z expresního vektoru pET32b v bakteriích *E. coli* kmen Rosetta s N- a C-terminální histidinovou kotvou (6×His tag) a thioredoxinem na N- konci. Bakterie byly kultivovány v 1 litru LB media při 37 °C. Po dosažení optické hustoty 0,8 byla narostlá kultura zchlazena na pokojovou teplotu a indukována exprese proteinu přidáním 0,5 mM IPTG, dále aerobně kultivována při teplotě 20 °C po dobu 20 hodin. Následně byla provedena centrifugace a pelet bakterií byl resuspendován v lyzačním pufru (1xPBS, 1 M NaCl, 4 mM βME, 2 mM Imidazol). Mechanické rozrušení buňek bylo provedeno na ledu sonikací. Sonikát byl centrifugován při 4 °C po dobu 45 minut/6000 g. Pro získání čistého TRPV1-CT byly použity chromatografické postupy zahrnující afinitní chromatografii a gelovou filtraci provedenou na koloně Superdex 75 column (Amersham Pharmacia Biotech). Protein TRPV1-CT byl ze supernatantu purifikován za použití chelatující sepharosy podle instrukcí výrobce (Amersham Biosciences). Protein byl eluován elučním pufrem F (1× PBS pufr, 0,5 M NaCl, 2 mM β-merkaptoethanol, 600 mM imidazol). Frakce obsahující čistý thioredoxin–TRPV1-CT protein byly spojeny a dialyzovány proti 1 l 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol a 2 mM DTT. Před druhým purifikačním krokem byl fúzní protein zkoncentrován za použití Millipore columns. Kontrola čistoty a přítomnosti proteinu v jednotlivých frakcích byla provedena na vertikální akrylamidové SDS elektroforese. Třetí purifikační krok za využití Calmodulin Sepharose 4B (Amersham Biosciences) byl proveden dle instrukcí výrobce na vzorcích s dostatečnou vazebnou afinitou pro kalmodulin. Koncentrace proteinů byla určena měřením absorbance na 280 nm.

4.5 Fluorescenční spektroskopie

4.5.1 Fluorescenční sonda TNP-ATP

Vazba ATP na fúzní bílkovinu C- konec TRPV1 – GST byla měřena nepřímo s využitím fluorescenční sondy 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrofenyl)adenosin-5'-trifosfát (TNP-ATP) (obr 11). Kvantový výtěžek fluorescence TNP-ATP je citlivý na polaritu okolního prostředí (Hiratsuka, Sakata et al. 1973; Hiratsuka and Uchida 1973), vazba sondy na hydrofobní ATP vazebné místo je tedy detekována jako zvýšení intenzity fluorescence spojené s posunem spektra směrem ke kratším vlnovým délkám (Obr. 12).



Obr. 11. 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrofenyl)adenosin-5'-trifosfát (TNP-ATP), fluorescenční analog ATP.

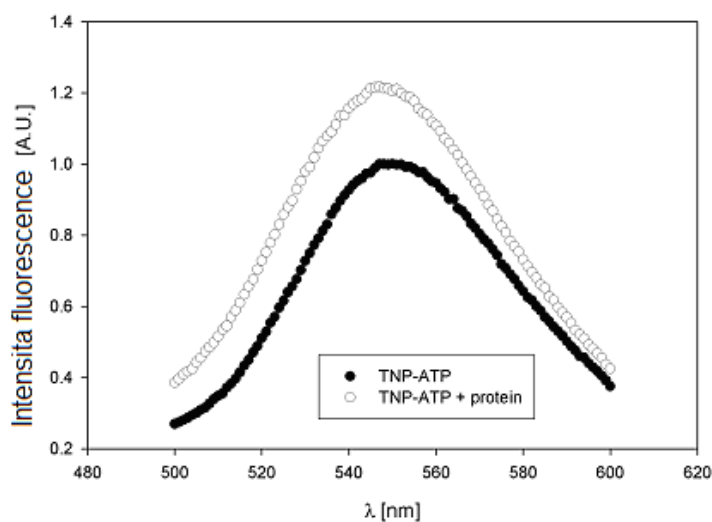
4.5.1.1 Stanovení disociační konstanty pro TNP-ATP

Veškerá fluorescenční měření byla provedena na fluorimetru FluoroMax-2 (Instruments S.A., Inc., JOBIN YVON/SPEX) při 22 °C. Pro stanovení disociační konstanty byla použita 50 µl křemenná kyveta. 2 µM C-konec TRPV1 – GST fúzní protein v pufru 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, byl excitován při 462 nm, a emise byla detekována při 527 nm. Šířka excitačních i emisních štěrbin byla 10 nm, integrační čas 5 s. Při měření parametru γ byl použit 24 µM C-konec TRPV1 – GST fúzní protein v pufru 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl. Do kyvety bylo titrováno

zvyšující se množství TNP-ATP. Při každé koncentraci fluorescenční sondy byla zaznamenána intenzita fluorescence. Titrace byla provedena v 10 krocích o objemu 0,5 μ l zásobního roztoku 50 μ M TNP-ATP. Signál bez přítomnosti fluorescenční sondy byl odečten jako pozadí. Relativní intenzita fluorescence byla normována tak, aby hodnota byla rovna jedné pro signál volné sondy o koncentraci 1 μ M. Vzhledem k tomu, že postupným přidáváním sondy rostl celkový objem roztoku, byly provedeny korekce koncentrací sondy a proteinu. Takto vzniklé křivky byly proloženy vztahem dle Kubala et al. (Kubala, Plášek et al. 2003):

$$F = [P]_T + \frac{\gamma - 1}{2} \left([P]_T + [E]_T + K_p - \sqrt{([P]_T + [E]_T + K_p)^2 - 4[P]_T[E]_T} \right) \quad (1)$$

kde F je normalizovaná intenzita fluorescence, $[P]_T$ je koncentrace TNP-ATP, $[E]_T$ je koncentrace C- konec TRPV1–GST fúzního proteinu, parametr γ je poměr směrnic závislostí signálu pro volnou a vázanou sondu a K_p je disociační konstanta. Z poměru směrnic závislostí signálu pro volnou a vázanou sondu byla pro parametr γ získána hodnota: $\gamma = 3,5 \pm 1,1$. Tato hodnota byla ponechána konstantní pro všechna měření.



Obr. 12. Emisní spektra TNP-ATP v přítomnosti proteinu (○) a za nepřítomnosti proteinu (●).

4.5.1.2 Stanovení disociační konstanty pro ATP

Vazba ATP na fúzní bílkovinu C- konec TRPV1–GST byla měřena nepřímo. Fluorescenční analog ATP (TNP-ATP) byl titrován k roztoku fúzní bílkoviny s 20 mM ATP pH 7,5. Takto vzniklé křivky byly prokládány vztahem (Kubala, Plášek et al. 2003):

$$F = [P]_T + \frac{\gamma - 1}{2} \left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} - \sqrt{\left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} \right)^2 - 4[P]_T[E]_T} \right) \quad (2)$$

kde $[A]_T$ značí koncentraci ATP a K_A je disociační konstanta pro ATP. Disociační konstanta pro TNP-ATP, K_P , byla určena výše popsáním způsobem. K_A byla stanovena nelineární metodou nejmenších čtverců. Všechny ostatní parametry byly drženy konstantní.

4.5.2 Fluorescenční sonda fluorescein isothiokyanat (FITC)

Fluorescein isothiokyanat (FITC) sonda vázající se na amino a sulfhydrylové skupiny. Při našich experimentech jsme využili její schopnost vázat se na lysin.

4.5.2.1 Značení sondou FITC

TRPV1-CT WT a jeho mutace Lys 735 Ala o koncentraci 4,5 μ M byly inkubovány ve tmě za přítomnosti 20 mM ATP a bez ATP s 10 μ M FITC v pufru 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl po dobu 1 hodiny při teplotě 6 °C. Nenavázaná sonda byla odstraněna dialýzou proti pufru 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl.

4.5.2.2 Zhášení fluorescence

Fluorescenční spektra byla měřena za pokojové teploty (22 °C) na spektrofotometru FluoroMax-2 (Jobin Yvon/Spex). Pro experimenty byla použita 50 µl křemenná kyveta. Označený protein byl excitován při 480 nm a emisní maximum bylo detekováno na vlnové délce 520 nm. Šířka excitačních i emisních štěrbin byla 5 nm, integrační čas 0,5 s. Intenzita fluorescence byla normalizována. Jako jednotková intenzita byla zvolena intenzita vzorku TRPV1-CT WT bez přítomnosti ATP. Do kyvety bylo titrováno zvyšující se množství AntiFluoresceinu a po jednotlivých krocích titrace byly sledovány emisní spektra.

Statické zhášení fluorescence je popsáno rovnicí (Lakowicz 2006):

$$F_0/F=1+K_S[Q] \quad (3)$$

Kde F_0 a F jsou intenzity fluorescence bez zhášedla a v přítomnosti zhášedla. $[Q]$ je koncentrace zhášedla a K_S je v případě statického zhášení asociační konstanta.

4.5.2.3 Časově rozlišené měření dohasínání fluorescence FITC

Pro přesnou charakterizaci mechanismu zhášení byly provedeny časově rozlišené experimenty. Časově rozlišené měření dohasínání fluorescence TRPV1-CT WT a Lys 735 Ala (v přítomnosti ATP a bez ATP) označených FITC (3 µM FITC) bylo provedeno metodou počítání fotonů “time-correlated single-photon counting (TCSPS)” na aparatuře PicoHarp300 (PicoQuant GmbH, Germany). Fluorescence byla excitována pulsním laserem na 445 nm a frekvenci 10 MHz, emise byla detekována na vlnové délce 520 nm při šířce štěrbin 8 nm pod „magickým“ úhlem, kde měřené hodnoty

intenzity dohasínání fluorescence $I(t)$ nezávisí na rotační difúzi fluoroforu a poskytuje nezkrácenou informaci o středních dobách života.

Signál zdroje a odezva přístroje „instrument response function (IRF)“ byla stanovena rozptylem při 445 nm a její hodnota byla 0,224 ns. Naměřená data byla vyhodnocována za použití programu FluoFit Pro (PicoQuant GmbH, Germany). Předpokládali jsme multiexponenciální dohasínání fluorescence podle následující rovnice:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (4)$$

kde τ_i jsou střední doby života excitovaného stavu a α_i jsou odpovídající amplitudy.

4.5.3 Fluorescenční sonda Alexa Fluor 488

Kalmodulin označený fluorescenční sondou Alexa Fluor 488 (Calmodulin from bovine brain Alexa Fluor 488 conjugate) byl komerčně získán u Molecular Probes (Oregon USA).

4.5.3.1 Měření vazby kalmodulinu pomocí anisotropie fluorescence

Veškerá fluorescenční měření byla provedena na fluorimetru ISS PC1™ Photon Counting Spectrofluorimeter při 22 °C v 1 ml křemenné kyvetě s 600 pmol označeného kalmodulinu (Calmodulin from bovine brain Alexa Fluor 488 conjugate) v pufru 50 mM Tris-HCl pH = 7,5, 2 mM CaCl₂ nebo 5 mM EGTA. Do kyvety bylo titrováno zvyšující se množství thio-redoxin - TRPV1-CT fúzního proteinu. Při každé koncentraci thio-redoxin - TRPV1-CT byla zaznamenána anisotropie fluorescence. Fluorescence byla excitována při 494 nm a emise byla detekována na vlnové délce 520 nm. Anisotropie byla spočítána podle vztahu:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}). \quad (5)$$

Frakce navázaného kalmodulinu (F_B) byla spočítána podle rovnice:

$$F_B = \frac{r_{obs} - r_{min}}{(r_{obs} - r_{min}) + Q(r_{max} - r_{obs})} \quad (6)$$

kde Q značí poměr kvantových výtěžků navázané a volné formy, r_{max} značí anisotropii v saturaci, r_{min} značí minimální pozorovanou anisotropii pro samotný kalmodulin a r_{obs} značí pozorovanou anisotropii pro určitou koncentraci thioredoxin - TRPV1-CT.

4.6 CD spektroskopie

Měření spekter cirkulárního dichroismu (CD) o spektrálním rozsahu 190-280 nm, bylo prováděno na spektropolarimetru J-810 (Jasco, Japonsko) při laboratorní teplotě v kyvetě o tloušťce 0,1 mm. K proplachování přístroje byl použit tlakový dusík. Pro všechna měření byla zvolena standardní citlivost, rozlišení a šířka štěrbiny 1 nm rychlost skenování 100 nm/min. Všechna spektra byla korigována na signál rozpouštědla (pufru).

Experiment byl proveden na třech různých vzorcích: TRPV1-CT fúzní protein, TRPV1-CT fúzní protein v komplexu s CaM a CaM. Byla tedy měřena spektra samostatných proteinů a jejich směsi v molárním poměru 1:1. Koncentrace proteinů v pufru 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl byla 6 μ M. Následně bylo provedeno porovnání směsi s matematickým součtem spekter jednotlivých složek.

Stanovení poměrného zastoupení jednotlivých konformací (α – šroubovice a β – list) bylo provedeno s využitím programů SELCON, CONTINLL, CDSSTR a K2D. Tento software je dostupný online na stránkách DICHROWEB (Whitmore and Wallace 2004).

4.7 Modelování struktury na základě homologie

4.7.1 Model izolovaného C – konce TRPV1

Homologní model TRPV1-CT (Ala 689 – Thr 801) byl získán na základě podobnosti s krystalovou strukturou proteinu fragilní histidinové triady (FHIT, PDB kód 1FIT) (Lima, D'Amico et al. 1997), který byl nalezen jako výsledek prohledávání databáze struktur proteinů PDB. Pro porovnání sekvencí byl použit BLAST algoritmus (SIB BLAST Network Service; <http://www.ca.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>). Sekvence ATP vazebného místa tzv. Walker A motiv byl modelován na základě podobnosti s Walker A motivy identifikovaných na vykrystalizovaných strukturách bakteriálních ABC transportérů, genu pro cystickou fibrosu CFTR (CFTR) (Lewis, Zhao et al. 2005), MalK (Diederichs, Diez et al. 2000), transportního proteinu asociovaného se zpracováním antigenů (TAP1) (Gaudet and Wiley 2001), ATP-vazebná podjednotka histidinové permeasy (HisP) (Hung, Wang et al. 1998) a bakteriální ATP vazebné kazety MJ0796 (Smith, Karpowich et al. 2002) (pdb kódy: 1XMJ, 1G29, 1JJ7, 1B0U, 1L2T). Cílový protein TRPV1-CT a templát FHIT (Lima, D'Amico et al. 1997) vykazovali 44% sekvenční homologie. Porovnání sekvencí bylo provedeno programem CLUSTALX 1.81 (Thompson, Higgins et al. 1994) (obr. 13). Vlastní model byl vytvořen programem Modeller 8v2 (Sali and Blundell 1993).

```

TRPV1-CT      AQESKNIWKLQRAITILDTEKSFLLKCMRKAFRSGKLLQUGFTPDGKDDYRWCFRUDEUNW
1FIT          -SFRFGQHLIKPSVUFLKTELSFALVNRKPVUPGHULUCPLRPVERFHDLRPDEUADL-F
               .  .  :: :::*.** **  **.. .*::*  : * : .  .* :: :
1G29          -----GPSGCGKTT-----
               * : **
1L2T          -----PSGSGKST-----
               * : **.
1JJ7          -----GPNGSGKST-----
               * . **.
1XMJ          -----GSTGAGKTS-----
               * * ** .
1B0U          -----GSSGSGKST-----
               * : **.

TRPV1-CT      TTWNTNUGIINEDPGNCEGVKRTLSFSLRSGRUSGRNWNKFALUPLLRDAST
1FIT          QT-TQRUGTUVEK--HFHGT--SLTFMQDGPEAGQTUKHUHUVLPRKAGD
               * . **. : * . : *. :*:***::.* :*: . * . : * * .
1G29          -----
1L2T          -----
1JJ7          -----
1XMJ          -----
1B0U          -----

```

Obr. 13. Porovnání sekvencí C- konce TRPV1 aminokyselinová sekvence (Ala 689 – Thr 801) a proteinu fragilní histidinové triady (PDB kód 1FIT). V oblasti ATP vazebného místa jsou zahrnuty struktury ABC transportérů nesoucí Walker A motiv.

4.7.2 Model izolovaného C– konce TRPV1 s ATP a TNP-ATP

Náboje ligandů byly spočítány programem Antechamber (Wang, Wang et al. 2006) a predikce vazby ligandů na C- konec TRPV1 byla provedena programem Dock 5 package (Ewing, Makino et al. 2001). Komplex byl vizualizován programem UCSF Chimera β 1 (Pettersen, Goddard et al. 2004). Ligandy byly umístěny do energeticky nejvýhodnější libovolné pozice v blízkosti Walker A motivu.

4.7.3 Model kalmodulin vazebného místa na C- konci TRPV1

Kalmodulin vazebné domény přítomné na většině proteinů zaujímají α – helikální strukturu. Bylo tedy opodstatnělé předpokládat, že i oblast kalmodulin vazebného místa na C- konci TRPV1 tvoří α -helix. Sekvence kalmodulin vazebného místa byla modelována na základě podobnosti s vazebnou doménou pro kalmodulin kinasy

lehkého řetězce myosinu (MLCK) (Ikura, Barbato et al. 1992). Pro porovnání sekvencí byl použit BLAST algoritmus (SIB BLAST Network Service; <http://www.ca.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>) a Calmodulin target database (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>). Model byl vytvořen programem Modeller 8v3 (Sali and Blundell 1993).

4.7.4 Model komplexu vazebného místa pro kalmodulin na C– konci TRPV1 s Ca²⁺ - kalmodulinem

Komplex vazebného místa pro kalmodulin na C- konci TRPV1 s Ca²⁺-kalmodulinem byl vytvořen a energeticky minimalizován s využitím programu Swiss-PdbViewer (GROMOS96 force field) (Guex and Peitsch 1997). Finální model byl dokončen a ověřen programem Coot (Emsley and Cowtan 2004).

5. DISKUSE A VÝSLEDKY

V této kapitole jsou diskutovány výsledky dvou prací: **I. ATP vazebné místo na C- konci vaniloidního receptoru TRPV1** a **II. Iontové interakce hrají klíčovou roli při vazbě C- konce TRPV1 na kalmodulin**. Zabývající se detailní charakterizací vazby C- konce vaniloidního receptoru TRPV1 a jeho ligandů.

5.1 ATP vazebné místo na C- konci vaniloidního receptoru TRPV1

ATP moduluje aktivitu TRPV1 receptoru přímou interakcí se dvěma vazebnými doménami vaniloidního receptoru TRPV1 (Kwak, Wang et al. 2000). Walker B ATP vazebná doména je pravděpodobně součástí cytoplazmatického N- konce (Caterina, Schumacher et al. 1997). Předmětem našeho zájmu byl však pouze izolovaný C- konec TRPV1. Právě zde se předpokládá ATP vazebná doména typu Walker A (Kwak, Wang et al. 2000). Přestože intracelulární ATP neplní úlohu přímého aktivátoru TRPV1, zvyšuje amplitudu proudu u aktivovaných receptorů po předchozím podání kapsaicinu (Tominaga and Tominaga 2005). Walker A a Walker B motivy vykazují sekvenční podobnost s mnoha dalšími ATP vazebnými doménami identifikovaných na strukturách bakteriálních ABC transportérů (Hung, Wang et al. 1998; Diederichs, Diez et al. 2000; Gaudet and Wiley 2001; Smith, Karpowich et al. 2002; Lewis, Zhao et al. 2005).

Walker A motiv je tvořen konzervovanou sekvencí aminokyselinových zbytků bohatou na glycin. Bylo publikováno několik variací tohoto motivu: GXXGXGK (Walker, Saraste et al. 1982), GXXXXGK (Driscoll, Komatsu et al. 1995), GXXGXXK (Sathishchandran, Hickman et al. 1992). U výše jmenovaných motivů bakteriálních ABC transportérů je Lys aminokyselinový zbytek označován za kruciální pro vazbu γ -fosfátu ATP (Story, Weber et al. 1992; Wiese, Hinz et al. 2006).

Naším cílem bylo ověření vazebných schopností izolovaného C- konce TRPV1 pro ATP. Dále pak identifikace významných aminokyselinových zbytků v oblasti Walker A motivu, které se na této vazbě podílejí. Za tímto účelem byly provedeny následující

bodové mutace: Pro 732 Ala, Asp 733 Ala, Gly 734 Ala, Lys 735 Ala, Asp 736 Ala a Asp737Ala. Vazebné schopnosti mutovaných konstruktů jsme zjišťovali fluorescenčně spektroskopickými metodami za použití fluorescenčního analogu ATP, TNP-ATP (Hiratsuka 2003). Následně pro ověření získaných výsledků bylo provedeno značení a zhášení fluorescence sondy fluorescein isothiokyanat (FITC). Získané údaje byly interpretovány s ohledem na trojrozměrný homologní model izolovaného C- konce TRPV1 s navázanými molekulami ligandů.

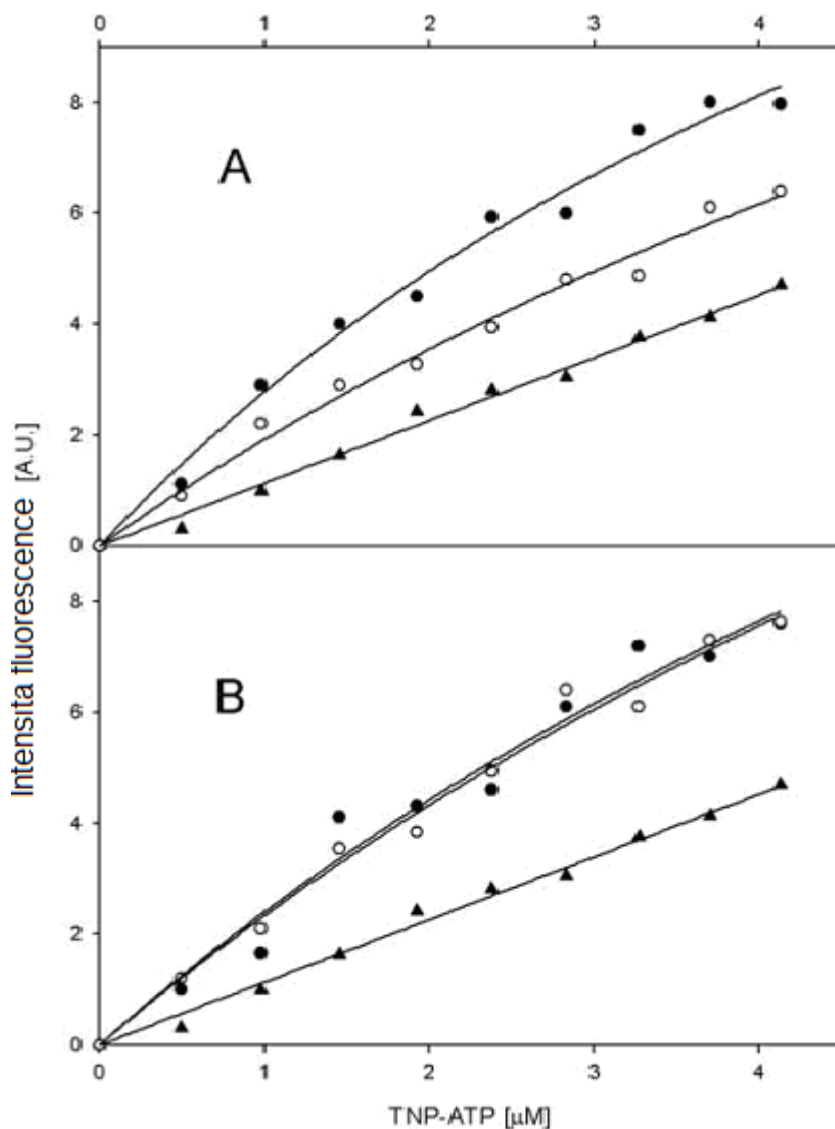
5.1.1 Vazba TNP-ATP

Vazba fluorescenční sondy TNP-ATP na izolovaný C- konec TRPV1 (WT) a na mutované konstrukty Pro 732 Ala, Asp 733 Ala, Gly 734 Ala, Lys 735 Ala, Asp 736 Ala a Asp 737 Ala byla detekována zvýšením intenzity fluorescence oproti sondě v pufru za nepřítomnosti proteinu (obr. 14).

Vzhledem k tomu, že izolovaný C- konec exprimovaný v bakteriích je velmi špatně rozpustný a má silné tendence se srážet bylo nemožné štěpit glutathion S-transferasu (GST protein). Při našich experimentech nebyla detekována vazba sondy na samotný GST protein, shodné výsledky byly publikovány i v předchozích pracích (Jha, Karnani et al. 2003; Kubala, Plášek et al. 2003). Je tedy možné předpokládat, že při titraci TNP-ATP byl vzrůst intenzity fluorescence zapříčiněn pouze vazbou sondy na izolovaný C- konec TRPV1. Veškeré experimenty byly provedeny s celým fúzním proteinem GST - TRPV1-CT.

Na základě předpokladu, že se na C- konci TRPV1 nachází pouze jedno vazebné místo pro ATP (Kwak, Wang et al. 2000), jsme stanovili disociační konstantu pro vazbu TNP-ATP na C- konec TRPV1 proložení naměřených bodů titrační křivky rovnicí pro jedno vazebné místo (1). Pro WT nabyla disociační konstanta hodnoty $1.01 \pm 0.16 \mu\text{M}$. V rámci experimentální chyby dosahovaly srovnatelných hodnot i konstanty u konstruktů s mutací Gly 734 Ala, Lys 735 Ala a Asp 736 Ala ($9.7 \pm 6.8 \mu\text{M}$, $2.12 \pm 0.34 \mu\text{M}$, and $2.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$). Naproti tomu mutace Asp 733 Ala zvýšila hodnotu disociační konstanty na $16 \pm 7 \mu\text{M}$. Tato mutace tedy způsobila pokles vazebných schopností C- konce TRPV1 pro TNP-ATP. Úplnou ztrátu vazebných schopností pro TNP-ATP jsme zaznamenali u konstruktů s mutovaným Pro 732 Ala a

Asp 737 Ala. Disociační konstanty všech měřených proteinů jsou uvedeny v tabulce I. Hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou, získanou minimálně ze tří nezávislých měření.



Obr.14. Vazba TNP-ATP na C- konec TRPV1 (a) konstruktu s mutací Lys 735 Ala (b), Titrace sondy do kyvety se vzorky proteinů (●) ve srovnání s titrací sondy do pufru (▲) zapříčinila vzrůst intenzity fluorescence. Vzrůst intenzity značí vazbu sondy na C- konec TRPV1. Podobný experiment byl provedený se vzorky s navázaným ATP (○), relativní snížení intenzity fluorescence je zapříčiněno kompeticí mezi ATP a TNP-ATP.

Tabulka I

Disociační konstanty pro vazbu TNP-ATP na izolovaný C- konec. Disociační konstanty byly zjištěny prokládáním titrační křivky rovnicí (1). Hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou získanou minimálně ze tří nezávisle na sobě provedených titrací.

Konstrukt	$K_{\text{TNP-ATP}}$ [μM]
WT	1.01 ± 0.16
P732A	>100
D733A	16 ± 7
G734A	9.7 ± 6.8
K735A	2.12 ± 0.34
D736A	2.5 ± 0.9
D737A	>100

5.1.2 Vazba ATP

Pro stanovení vazby ATP byl proveden kompetitivní experiment, kdy k roztoku fúzní bílkoviny s ATP byla titrována fluorescenční sonda TNP-ATP. Při našich kompetitivních experimentech musely být splněny pouze dva základní předpoklady (i) na měřeném proteinu je pouze jedno vazebné místo pro ATP a TNP-ATP (ii) TNP-ATP a ATP se nemohou vázat na protein současně. Pokud jsou tyto podmínky splněny je možné stanovit disociační konstantu pro ATP i v případě, že TNP-ATP je vytěsněno pouze částečně. Po navázání fluorescenční sondy se zvýšila intenzita fluorescence, došlo také k posunu emisního maxima směrem ke kratším vlnovým délkám. Tyto údaje naznačují snížení polarizace prostředí v okolí fluorescenční sondy TNP-ATP. Tyto hodnoty byly nižší ve srovnání s hodnotami získanými při titraci TNP-ATP do roztoku čisté fúzní bílkoviny bez přítomnosti ATP. Toto snížení hodnot intenzity fluorescence naznačuje přítomnost komplexu ATP – protein GST-TRPV1-CT během titrace a dovoluje nám sledovat postupné vytěšňování molekul ATP fluorescenční sondou (obr. 14).

Dřívější publikace uvádějí, že disociační konstanta pro ATP je zhruba o tři řády vyšší než konstanta naměřená pro fluorescenční analog TNP-ATP (Capieaux, Rapin et al. 1993; Kubala, Hofbauerová et al. 2002; Rai, Shukla et al. 2005). Stejný fenomén jsme

sledovali i při stanovování vazebné afinity C- konce TRPV1 pro tyto ligandy. Na vazbě TNP-ATP se zřejmě podílí i trinitrofenylová část molekuly a fluorescenční sonda zaujímá odlišnou pozici v ATP vazebné kapse (Hiratsuka and Uchida 1973; Kubala, Plášek et al. 2003; Kubala, Plášek et al. 2004; Lánský, Kubala et al. 2004).

Hodnota disociační konstanty pro vazbu ATP na C- konec TRPV1 byla zjištěna proložení naměřených bodů rovnicí (2), pro WT byla 5.3 ± 2.1 mM. Měření provedené při různých hodnotách koncentrace ATP (10, 15, 20 mM) neukázalo rozdílné výsledky stanovených konstant, což potvrzuje správnost předpokladu, že na C- konci TRPV1 se nachází pouze jedno ATP vazebné místo (Kwak, Wang et al. 2000).

Disociační konstanty konstruktů s bodovými mutacemi Asp 733 Ala, Gly 734 Ala nebo Asp 736 Ala byly srovnatelné v rámci experimentální chyby s WT (9.6 ± 5.4 mM, 3.9 ± 2.1 mM a 2.4 ± 1 mM). Naproti tomu byla vazba ATP silně inhibována bodovou mutací Lys 735 Ala.

Stanovení vazebné afinity k ATP u konstruktů s mutovaným Pro 732 a Asp 737 nebylo touto metodou možné provést. Neboť jak již bylo uvedeno výše tyto mutace způsobily úplnou ztrátu vazebných schopností pro fluorescenční analog TNP-ATP. Z obrázku 14. je viditelné, že titrační křivka kopíruje křivku získanou při měření vazby TNP-ATP za nepřítomnosti ATP, proto bylo možné hodnotu disociační konstanty pouze zhruba odhadnout (>100 mM). Hodnoty disociačních konstant jsou uvedeny v tabulce II. Tyto hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou, získanou minimálně ze tří nezávislých měření.

Tabulka II.

Disociační konstanty pro vazbu ATP na izolovaný C- konec TRPV1. Disociační konstanty byly zjištěny prokládáním titrační křivky rovnicí (2). Hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou získanou minimálně ze tří nezávisle na sobě provedených titrací. N.A. (not analysed) data nebyla podrobena výpočtu.

Konstrukt	K_{ATP} [mM]
WT	5.3 ± 2.1
P732A	N.A.
D733A	9.6 ± 5.4
G734A	3.9 ± 2.1
K735A	>100
D736A	2.4 ± 1
D737A	N.A.

5.1.3 Značení fluorescenční sondou FITC

Pro potvrzení významu Lys 735 pro vazbu ATP byl proveden experiment s označeným C- koncem TRPV1 fluorescenční sondou fluorescein isothiokyanat (FITC). FITC je sonda vázající se na amino a sulfhydrylové skupiny. Tato sonda je známá svojí schopností vázat se na lysin (Mitchinson, Wilderspin et al. 1982; Farley, Tran et al. 1984). V našich experimentech jsme tuto její vlastnost využili a předpokládali, že ATP a FITC sdílejí společné vazebné místo. Abychom zjistili zda některá vazebná místa FITC jsou obsazena molekulami ATP, bylo provedeno značení na čtyřech vzorcích: TRPV1-CT WT a TRPV1-CT Lys 735 Ala v přítomnosti ATP a bez ATP.

Molární poměr FITC:protein byl stanoven měřením absorbance na vlnových délkách 280 nm a 488 nm. Jednotlivé hodnoty byly pro WT 0,56:1, 0,61:1 pro WT-ATP, 0,30:1 pro Lys 735 Ala a 0,42:1 pro Lys 735 Ala-ATP. Při kontrolních experimentech bez přítomnosti bílkoviny nebyl prokázán žádný vliv ATP na spektrální vlastnosti FITC.

5.1.4 Zhášení FITC

Intenzita fluorescence označených vzorků byla zhášena AntiFl a naměřené hodnoty analyzovány dle Stern-Volmerovy rovnice (Lakowicz 2006). Stern-Volmerův zhášecí koeficient byl stanoven metodou nejmenších čtverců. Tento koeficient vypovídá o míře zhášení fluoroforu.

Zhášecí experiment byl uspořádán do čtyř částí: WT, Lys 735 Ala, WT-ATP, Lys 735 Ala-ATP. Data byla statisticky zpracována metodou *t*-test. Hodnoty zhášecí konstanty WT byly srovnávány s WT-ATP, Lys 735 Ala, Lys 735 Ala-ATP. Stern-Volmerova konstanta pro WT byla signifikantně nižší ($p=0,04$) než u ostatních měřených vzorků. Můžeme se domnívat, že je zde fluorescenční sonda navázaná uvnitř ATP vazebné kapsy, tudíž není zcela exponovaná zhášedlu. Soubor hodnot zhášecích konstant jsou uvedeny v tabulce III.

Tabulka III.

Stern-Volmerova zhášecí konstanta TRPV1 (WT) označeného FITC a konstruktů s bodovou mutací Lys 735 Ala v pufru s ATP a bez ATP. Zhášecí konstanty byly stanoveny prokládáním naměřených bodů rovnicí (3). Hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou získanou minimálně ze tří nezávisle na sobě provedených titrací.

Konstrukt	Zhášecí konstanta [ml/μg]
WT	0.35 ± 0.03
WT + ATP	0.85 ± 0.05
K735A	0.62 ± 0.04
K735A + ATP	0.65 ± 0.05

5.1.5 Dohasínání fluorescence FITC

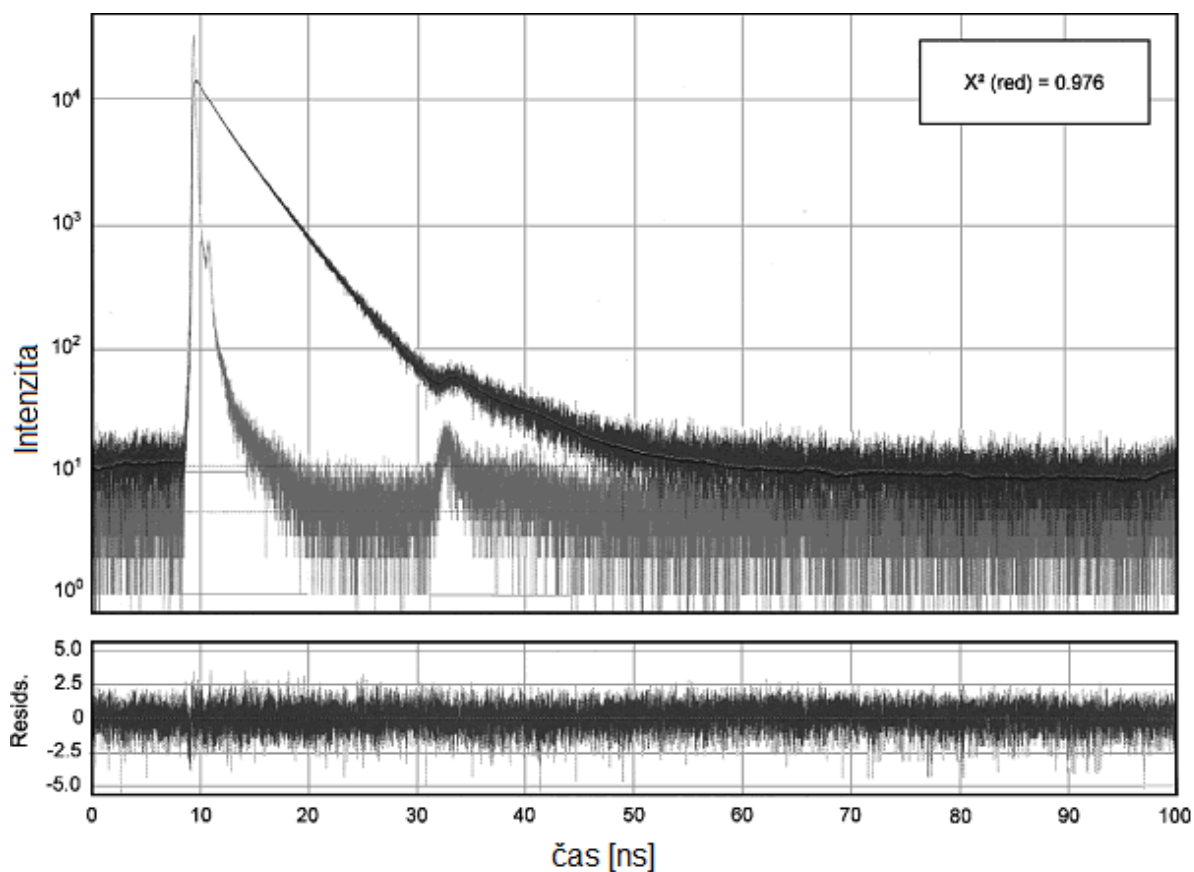
Abychom charakterizovali zda se jedná o statické či dynamické zhášení intenzity fluorescence, byla provedena měření dohasínání intenzity fluorescence. Experiment byl

proveden na vzorcích WT, Lys 735 Ala, WT-ATP, Lys 735 Ala-ATP označených FITC a byl uspořádán do dvou kroků. Nejprve za přítomnosti zhašedla AntiFl, ve druhé fázi bylo provedeno měření dohasínání fluorescence FITC bez AntiFl. Bylo provedeno multiexponencialní proložení křivky pro tři proměnné a výsledné doby života byly 3.9 ns, 1.8 ns, a 0.4 ns. Přítomnost zhašedla AntiFl neovlivnila doby dohasínání ani v jednom z provedených experimentů (tabulka IV.). Tento jev je typický pro případ statického zhašení.

Tabulka IV.

Vzorek	α_1	τ_1 (ns)	α_2	τ_2 (ns)	α_3	τ_3 (ns)	χ^2
WT	0.54 <0.52;0.56>	3.88 <3.85;3.92>	0.26 <0.25;0.28>	1.88 <1.63;2.05>	0.19 <0.18;0.21>	0.47 <0.40;0.53>	0.976
WT+AntiFl	0.56 <0.53;0.58>	3.88 <3.84;3.92>	0.26 <0.24;0.27>	1.83 <1.67;2.04>	0.18 <0.17;0.20>	0.43 <0.36;0.51>	0.946
WT-ATP	0.41 <0.38;0.43>	3.86 <3.80;3.92>	0.28 <0.26;0.30>	1.78 <1.61;1.92>	0.31 <0.29;0.34>	0.43 <0.38;0.48>	0.944
WT-ATP +AntiFl	0.44 <0.40;0.46>	3.85 <3.80;3.92>	0.28 <0.26;0.30>	1.71 <1.51;1.94>	0.28 <0.25;0.31>	0.38 <0.31;0.46>	0.929
K735A	0.37 <0.32;0.41>	3.84 <3.75;3.97>	0.32 <0.29;0.35>	1.68 <1.45;2.00>	0.31 <0.26;0.35>	0.40 <0.30;0.51>	0.859
K735A+AntiFl	0.36 <0.28;0.41>	3.95 <3.82;4.17>	0.32 <0.28;0.36>	1.87 <1.54;2.31>	0.32 <0.27;0.36>	0.45 <0.33;0.57>	0.842
K735A-ATP	0.22 <0.22;0.24>	3.84 <3.79;3.90>	0.28 <0.28;0.31>	1.60 <1.49;1.71>	0.49 <0.49;0.53>	0.41 <0.38;0.44>	0.968
K735A-ATP + AntiFl	0.23 <0.21;0.25>	3.90 <3.83;3.97>	0.27 <0.26;0.29>	1.63 <1.50;1.78>	0.49 <0.48;0.52>	0.41 <0.38;0.44>	0.934

Všechna proložení byla charakterizována hodnotou χ^2 kolem 1.00 (obr 15).



Obr. 15. Dohasínání intenzity fluorescence sondy FITC navázané na TRPV1- CT a signál zdroje – odezva přístroje (IRF).

5.1.6 Molekulární model C- konce TRPV1 s molekulami ATP a TNP-ATP

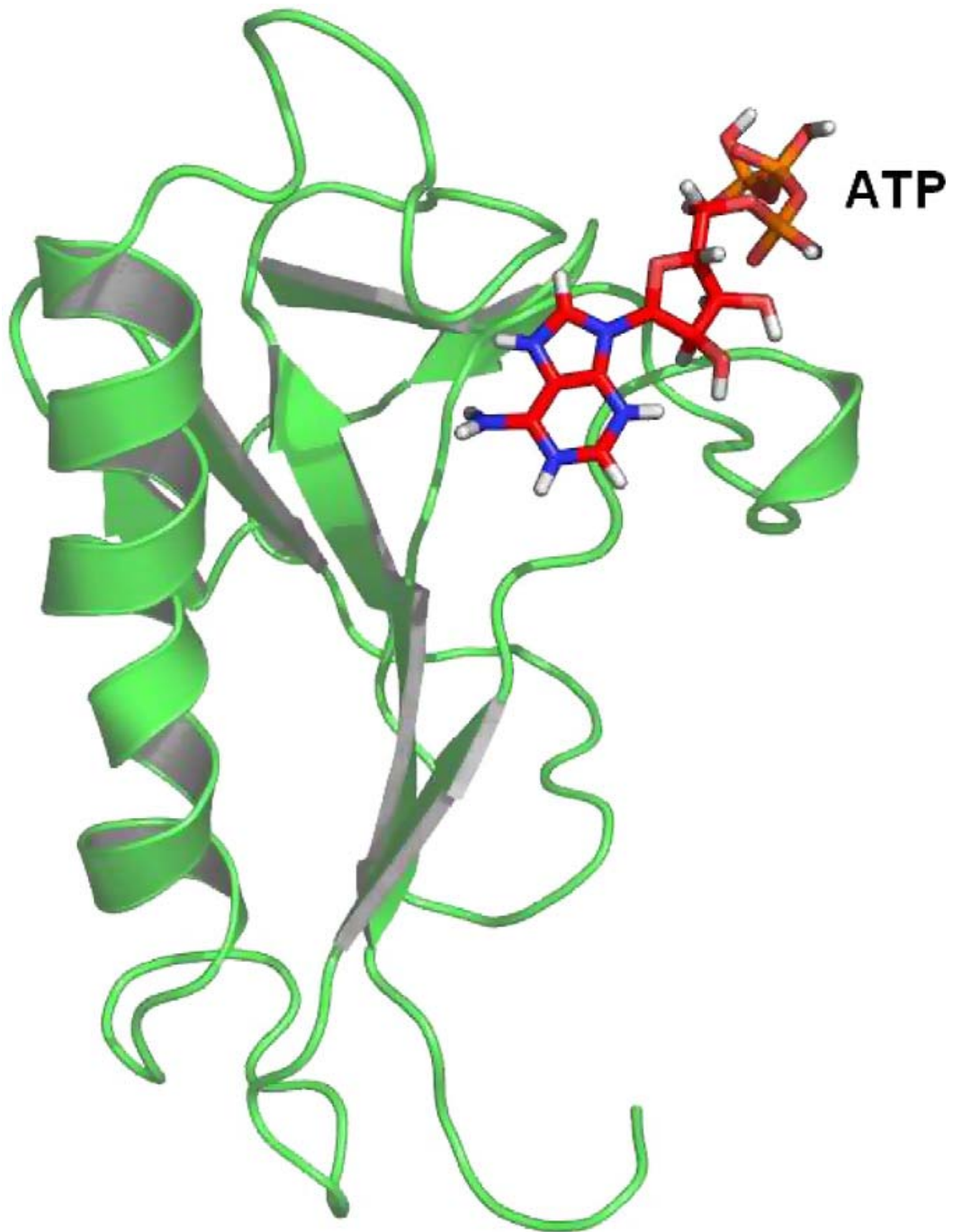
Pro přiblížení vazby ATP a TNP-ATP na izolovaný C- konec TRPV1 ze strukturního hlediska jsme vytvořili trojrozměrný model C- konce TRPV1 (sekvence aminokyselin Ala 682 – Thr 801), který zahrnoval ATP vazebnou doménu Walker A typu s navázanými molekulami ligandů. Detailní model 3D struktury byl vytvořen na základě 44% analogie se známou strukturou proteinu fragilní histidinové triady (Lima, D'Amico et al. 1997). ATP vazebná doména byla modelována dle dalších struktur obsahujících Walker A motiv: genu pro cystickou fibrosu CFTR (cystic fibrosis transmembraneregulator) (Lewis, Zhao et al. 2005), MalK (Diederichs, Diez et al. 2000), transportního proteinu asociovaného se zpracováním antigenů (TAP1) (Gaudet

and Wiley 2001), ATP vazebné jednotky histidinové permeasy (HisP) (Hung, Wang et al. 1998) a bakteriální ATP vazebné kazety MJ0796 (Smith, Karpowich et al. 2002).

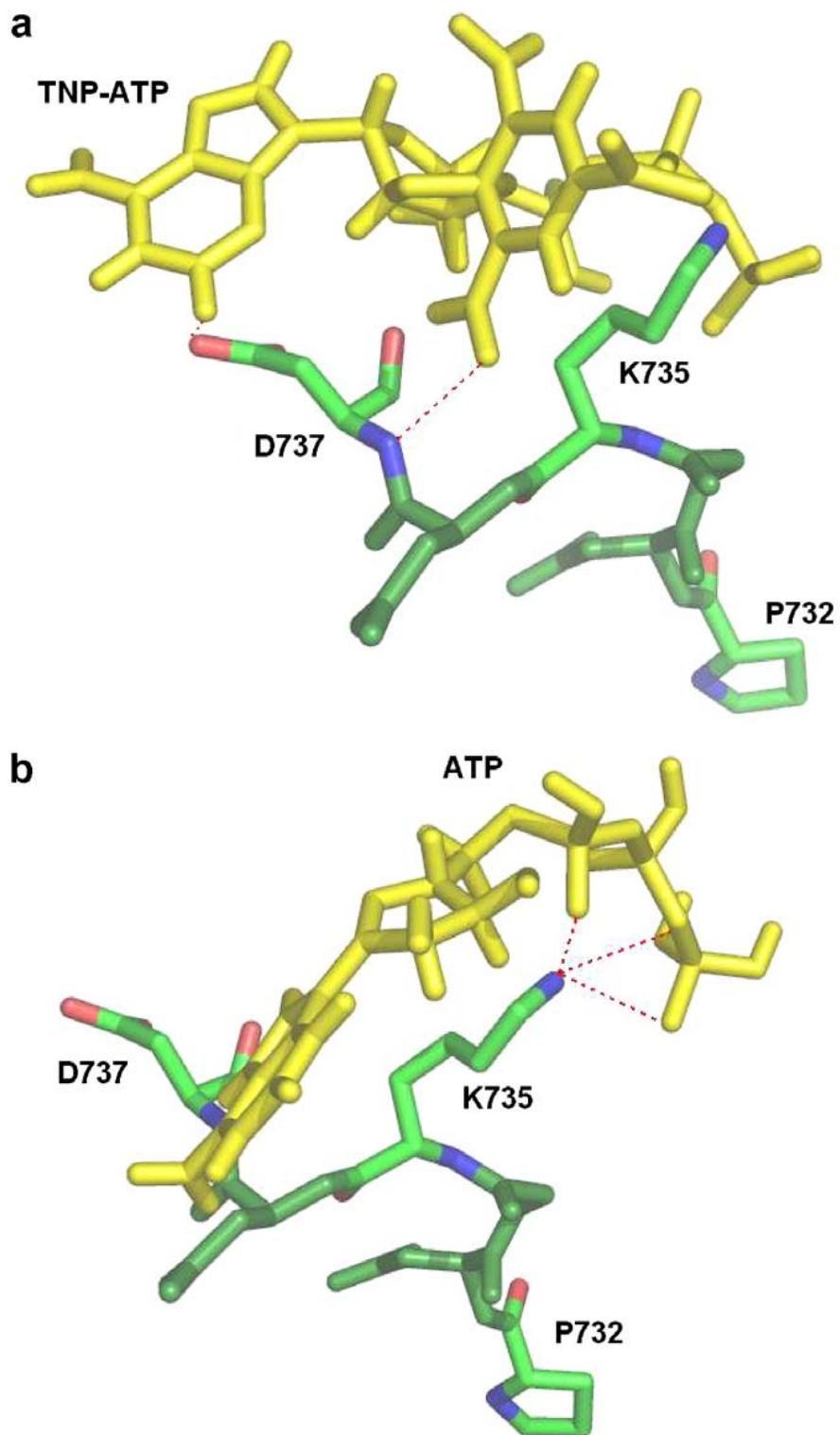
Model byl vytvořen pomocí programu pro Modeller. Jeho kvalita byla ověřena programem ProCheck (Laskowski, Moss et al. 1993). Dle Ramachandranova diagramu se nachází 84,8% aminokyselinových zbytků v nejvíce přípustných oblastech, tedy zaujímají uspokojivou geometrii. Celkový g faktor získané struktury byl $-0,31$. Hodnoty g faktoru by se měly pohybovat nad hranicí $-0,5$. Struktury, které vykazují hodnoty nižší než $-1,0$ vyžadují další přezkoumání (Laskowski, Moss et al. 1993).

Podařilo se nám rovněž predikovat vazbu ligandů ATP a TNP-ATP na C- konec TRPV1 a tak předpovídat aminokyseliny tvořící ATP-vazebné místo za použití programu Dock5 (Ewing, Makino et al. 2001). Konečný model C- konce TRPV1 (sekvence aminokyselin Ala 682 – Thr 801) s navázanou molekulou ATP je znázorněn na obrázku 16.

Na obrázku 17 (a) a (b) je detail modelu v oblasti ATP vazebného místa typu Walker A s navázanými molekulami ligandů ATP a TNP-ATP. Na základě takto získané struktury se pro vazbu TNP-ATP zdá být významný aminokyselinový zbytek Asp 737. Tento předpoklad souhlasí s výše uvedenými experimentálně získanými výsledky (tabulka II). Z obrázku (b) je zřejmé, že náš model předpokládá přímou účast aminokyselinového zbytku Lys 735 na vazbě ATP. γ a β fosfát ATP interaguje s postranním řetězcem tohoto zbytku. Předpokládaná vazba Lys 735 je v souladu s mutagenezní studií, kdy záměnou Lys 735 za alanin došlo k úplné ztrátě vazebných schopností izolovaného C- konce TRPV1 pro ATP.



Obr. 16. Molekulární model C- konce TRPV1 (sekvence aminokyselin Ala 682 – Thr 801) s molekulou ATP. Protein fragilní histidinové triady je ze 40% sekvenčně podobný C- konci TRPV1, vzhledem k tomu, že neobsahuje Walker A motiv, byla oblast ATP vazebné domény modelována dle struktur z rodiny bakteriálních ABC transportérů (pdb kódy: 1XMJ, 1G29, 1JJ7, 1B0U, 1L2T).



Obr. 17. Detail oblasti Walker A ATP vazebného místa. (a) Úsek pěti aminokyselinových zbytků (Pro 732 – Asp 737) s molekulami TNP-ATP a ATP (b). Předpokládané vazebné interakce jsou znázorněny přerušovanou čarou.

5.1.7 Diskuse k práci I.

V této práci jsme sledovali vazebné schopnosti Walker A motivu lokalizovaném na C- konci TRPV1 pro ATP. Pro určení významných aminokyselinových zbytků v oblasti Walker A motivu jsme použili kombinaci molekulárně biologických metod, fluorescenční spektroskopie a molekulárního modelování.

Dříve publikovaný model C- konce TRPV1 (Vlachová, Teisinger et al. 2003) byl vytvořen na základě podobnosti s proteinem fragilní histidinové triady, jehož struktura byla nedávno vyřešena krystalograficky (Lima, D'Amico et al. 1997). Tato struktura však neposkytuje trojrozměrné informace o ATP vazebné doméně typu Walker A která byla identifikována na C- konci TRPV1, a která byla předmětem našeho zájmu. Abychom získali realističtější náhled na oblast vazebného místa pro ATP, použili jsme pro modelování vazebného místa pro ATP další templátové struktury, dle kterých byl vytvořen model ATP vazebné domény (obr.16). Metodou predikce vazby ligandů jsme určili pravděpodobné vazebné interakce v oblasti Walker motivu A/ATP a Walker motivu A/TNP-ATP (obr. 17). Provedli jsme kompetitivní vazebnou studii ATP na fúzní protein GST-TRPV1-CT a jeho mutanty. Disociační konstanta pro GST-TRPV1-CT WT určená našimi experimenty byla pro TNP-ATP $1,01 \pm 0,16 \mu\text{M}$ a $5,3 \pm 2,1 \text{ mM}$. Hodnota pro ATP se shoduje v rámci experimentální chyby s dříve publikovanými výsledky skupiny Kwak et al. (Kwak, Wang et al. 2000), který stanovil disociační konstantu za použití elektrofyziologických metod ($3,3 \text{ mM}$). Mutace Gly 734 Ala a Asp 736 Ala neovlivnili vazebnou afinitu ani pro jeden ze sledovaných ligandů. Mírný pokles vazebných schopností pro TNP-ATP byl zaznamenán u konstruktů s mutovaným Asp 733 Ala, nicméně tento konstrukt interagoval s ATP obdobně jako WT. Na základě našeho modelu však nepředpokládáme přímou účast tohoto rezidua na vazbě TNP-ATP. Naproti tomu zcela odlišné chování jsme zaznamenali u mutace Lys 735 Ala. Mutace tohoto rezidua způsobila silnou inhibici vazby ATP ačkoliv si tento konstrukt ponechal schopnost vázat fluorescenční analog TNP-ATP. Tento jev není zcela typický, nicméně byl již v minulosti popsán (Lánský, Kubala et al. 2004). Tyto výsledky poukazují na rozdílnou pozici adenosin-5-trifosfátové části TNP-ATP a adenosin-5-trifosfátu v oblasti ATP vazebného místa. Pravděpodobnou příčinou je podíl trinitrofenylové části TNP-ATP, která může stericky bránit pozici sondy ve vazebné kapse. Můžeme se také domnívat, že se zde vyskytují

specifické interakce mezi TNP a proteinem, které jsou významnější než samotná vazba adenosin-5-trifosfátu.

Predikcí vazby molekuly ATP na homologní model C- konce TRPV1 jsme dospěli k předpokladu, že γ a β fosfát molekuly ATP interaguje s postranním řetězcem aminokyselinového zbytku Lys 735 vzdálených 2,9 Å a 3,0 Å (obr 17). Tento předpoklad je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Wiese, Hinz et al. 2006), v této práci bylo poukázáno na přímou vazbu ATP prostřednictvím γ fosfátu na postranní řetězec konzervovaného Lys uvnitř Walker A motivu lidského RAD51D proteinu.

Pro ověření významu tohoto aminokyselinového zbytku jsme provedli značení proteinu fluorescenční sondou FITC a následné zhášení intenzity fluorescence za použití zhášedla AntiFl. Při experimentu jsme využili schopnost isothiokyanátové skupiny se vázat na Lys aminokyselinové zbytky, které jsou exponované rozpouštědlu. Vazebná afinita jednotlivých reziduí je ovlivněna i řadou dalších faktorů jako je sterická přístupnost, podílení se na jiných vazebných interakcích (např. vodíkové můstky) nebo interakce fluoresceinové části sondy s dalšími aminokyselinovými rezidui v blízkosti Lys. Poměr FITC:protein byl nižší než 1:1. Skutečnost, že se nám podařilo označit i konstrukt s mutovaným Lys 735 potvrzuje předpoklad, že byl označen více než jeden Lys aminokyselinový zbytek. Přesto u tohoto konstruktu byla účinnost značení snížena téměř dvakrát. Tyto výsledky naznačují, že Lys 735 má nejvyšší afinitu k FITC a je tedy značen přednostně. Jak již bylo ukázáno v předešlých publikacích, aromatická část sondy pravděpodobně zaujímá pozici aromatické části ATP (Mitchinson, Wilderspin et al. 1982; Linnertz, Lanz et al. 1999).

Hodnota Stern-Volmerovy konstanty $K_{sv} = 0,35 \pm 0,03$ ml/ μ g určená pro TRPV1-CT WT označené FITC bez přítomnosti ATP naznačuje, že tento aminokyselinový zbytek není přímo exponován rozpouštědlu. Zhášecí konstanty pro WT a konstrukt s mutovaným Lys 735 v přítomnosti ATP a bez ATP poukázaly na několik zajímavých skutečností. (i) K_{sv} pro WT a konstrukt s mutovaným Lys 735 nabyly rozdílných hodnot, což naznačuje fakt, že byly označeny rozdílné aminokyselinové zbytky. (ii) Hodnoty zhášecích konstant v přítomnosti ATP a bez ATP u konstruktu s mutovaným Lys 735 byly totožné, můžeme se tedy domnívat, že ATP neinteraguje s tímto konstruktem. (iii) Naproti tomu jsme detekovali rozdílné hodnoty K_{sv} u WT s ATP a WT bez ATP. (iv) Rozdílné hodnoty pro Stern-Volmerovy zhášecí konstanty pro WT a

Lys 735 mutaci potvrzují, že u obou konstruktů byly označeny rozdílné aminokyselinové zbytky. Je velmi pravděpodobné, že vazba ATP na C- konec TRPV1 indukuje určité konformační změny, které zabraňují označení Lys reziduí, které byly označeny na mutovaném konstruktu (Lys 735 Ala), naproti tomu zde mohou být exponovány jiné aminokyselinové zbytky.

Bylo potvrzeno, že vazba ATP na WT TRPV1-CT inhibovala značení Lys 735. Dále jsme prokázali konformační změny WT TRPV1-CT indukované vazbou ATP, které však nebyly detekovány na konstruktu s mutovaným Lys 735. Tyto výsledky potvrzují poznatky získané TNP-ATP kompetitivní studií, kdy mutace Lys 735 zcela inhibovala vazbu ATP.

Konstrukty s bodovými mutacemi Pro 732 Ala a Asp 737 Ala pozbyly zcela vazebnou schopnost pro TNP-ATP, nebylo tedy možné kompetitivní studií stanovit disociační konstanty pro ATP (viz. tabulky I. a II.). Vzhledem k tomu, že ATP a TNP-ATP zaujímá odlišnou pozici v oblasti ATP vazebného místa, je vzdálenost Meissenheimerova komplexu molekuly TNP-ATP od Asp 737 pouze 0,2 nm. Můžeme tedy dle našeho modelu předpokládat existenci vodíkové vazby mezi hydroxylovou skupinou Asp 737 a adeninovou částí TNP-ATP (obr 17). Náš model však nenaznačuje význam tohoto rezidua pro vazbu ATP, nicméně tento předpoklad nebylo možné ověřit experimentálně díky již výše zmiňované ztrátě vazebných schopností pro fluorescenční analog TNP-ATP.

Obdobně bodová mutace Pro 732 Ala inhibovala vazbu TNP-ATP, avšak v tomto případě předpokládáme spíše celkovou konformační změnu v oblasti ATP vazebného místa. Vzhledem k poměrně značné vzdálenosti (1,1 nm) od molekuly ATP se tento aminokyselinový zbytek může na vazbě podílet pouze nepřímo tím že zajišťuje náležitou konformaci ATP vazebné oblasti.

V dříve publikovaných studiích byly popsány π - π interakce mezi adeninovou částí ATP a aromatickými aminokyselinovými zbytky ABC transportérů (Ambudkar, Kim et al. 2006). Homologní model C- konce TRPV1 však neukazuje žádné orientované aromatické řetězce, které by mohly na této vazbě podílet. Dle modelu můžeme předpokládat, že se vazby účastní pouze fosfátová část molekuly ATP.

Za použití několika výše uvedených metod jsme prokázali, že Lys 735 lokalizovaný uvnitř Walker A motivu na C- konci TRPV1 se významně podílí na vazbě ATP.

Predikce vazby ATP do oblasti ATP vazebného místa na homologním modelu C- konce TRPV1 ukázala přímou interakci Lys 735 a γ fosfátu ATP. Obdobné výsledky byly publikovány i pro další struktury nesoucí Walker A motiv (Story, Weber et al. 1992; Wiese, Hinz et al. 2006). Byly identifikovány i dva aminokyselinové zbytky: Pro 732 a Asp 737, které jsou nezbytné pro vazbu TNP-ATP. Jak vazebné experimenty s fluorescenční sondou TNP-ATP tak i molekulární modelování naznačují, že molekuly obou ligandů (TNP-ATP, ATP) nezauímají totožnou pozici v oblasti ATP vazebného místa Walker A typu na C- konci TRPV1.

5.2 Iontové interakce hrají klíčovou roli při vazbě C- konce TRPV1 na kalmodulin

TRPV1 je neselektivní kationtový kanál umožňující vstup jednomocným kationtům a některým dvojmocným kationtům (Ca^{2+} , Mg^{2+}) do buňky. Jak již bylo zmíněno výše, kalciové kationty se podílejí na procesu desenzitizace receptoru TRPV1, a to především na její rychlé kalcium dependentní komponentě (Caterina, Schumacher et al. 1997).

Kalmodulin (CaM) je ubikvitární kalcium vázající protein, který se účastní řady fyziologicky významných procesů. V souvislosti s regulací aktivity závislé na vápníku byla popsána jeho interakce i s některými členy TRP rodiny iontových kanálů (Rosenbaum, Gordon-Shaag et al. 2004; Zhu 2005). U řady členů byla identifikována na obou cytoplazmatických koncích mnohočetná vazebná místa pro tento protein (CaM-BD), která vykazují rozdílné chování v závislosti na přítomnosti vápníku (Zhu 2005). Kalmodulin vazebná doména na N- konci TRPV1 byla lokalizována v oblasti ankyrinových domén (Rosenbaum, Gordon-Shaag et al. 2004). V této práci jsme se zabývali detailním popisem sekvence vazebného motivu pro kalmodulin na C- konci TRPV1.

Iontové kanály nesoucí vazebné domény pro kalmodulin nevykazují žádnou sekvenční homologii, přesto sdílejí určité společné strukturní rysy. Základním společným znakem je přítomnost hydrofobních aminokyselinových zbytků, které zauímají konzervované pozice. Pozice hydrofobních reziduí se stala klíčovou pro vytvoření nomenklatury, dle které je možné rozdělení CaM-BD do skupin obsahujících

definované kalmodulin vazebné motivy. Dalším typickým znakem je množství bazických aminokyselinových zbytků, které obklopují konzervované hydrofobní rezidua (Vetter and Leclerc 2003).

Přestože Numazaki et al. (Numazaki, Tominaga et al. 2003) popsal 35 aminokyselin dlouhý fragment C- konce TRPV1 (767–801) a jeho kalcium dependentní interakci s kalmodulinem, nebyl zde identifikován žádný z již popsaných kalmodulin vazebných motivů. Tento ne zcela typický motiv nejlépe koresponduje s takzvaným 1-8-14 motivem, a to na pozici 1 a 14 (dle Calmodulin Target Database <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>).

Naším cílem bylo detailní studium atypického vazebného motivu pro kalmodulin. Sledovali jsme tedy význam všech hydrofobních a bazických aminokyselinových zbytků v této oblasti. Bylo vytvořeno devět bodových mutací v oblasti kalmodulin vazebného motivu na C- konci TRPV1 (Val 769 Ala, Arg 771 Ala, Leu 777 Ala, Arg 778 Ala, Arg 781 Ala, Val 782Ala, Arg 785 Ala, Lys 788 Ala, and Arg 797 Ala) a sledován jejich vliv na vazbu kalmodulinu na izolovaný C- konec TRPV1-thioredoxin fúzní protein.

5.2.1 Příprava rozpustného fúzního proteinu C-konce TRPV1

Při předchozích experimentech pro stanovení vazby ATP jsme exprimovali TRPV1 – CT (aminokyselinová sekvence Val 686- Lys837) jako fúzní protein s glutathion S-transferasou (Gryčová, Lánský et al. 2007). Abychom docílili dostatečné výtěžky a vyšší rozpustnost proteinu, exprimovali jsme izolovaný C- konec TRPV1 jako fúzní protein s thioredoxinem na N- konci a s N- a C- terminální histidinovou kotvou. Všechny exprimované konstrukty byly rozpustné a získali jsme dostatečnou koncentraci a množství pro provedení spektroskopických experimentů. Vzhledem k tomu, že izolovaný C- konec TRPV1 má silné tendence agregovat bylo nemožné thioredoxin štěpit. Z tohoto důvodu byly provedeny níže uvedené spektroskopické experimenty s celým fúzním proteinem. Měřením cirkulárního dichroismu thioredoxin–TRPV1-CT fúzního proteinu jsme potvrdili teoreticky predikovanou sekundární strukturu založenou na analýze primární sekvence (26% β -list, 37% α -helix), což naznačuje, že protein byl v nativním stavu.

5.2.2 Vazba kalmodulinu na C- konec TRPV1

Pro získání bližších poznatků o atypickém kalmodulin vazebném motivu přítomném na C- konci TRPV1 jsme provedli bodové mutace všech bazických a klíčových hydrofobních aminokyselinových zbytků v této oblasti. Metodou měření anisotropie fluorescence byl sledován vliv těchto aminokyselinových zbytků na vazbu izolovaného C- konce TRPV1 a kalmodulinu. Vzrůstající množství fúzního proteinu TRPV1-CT bylo titrováno do kyvety s fluorescenčně označeným kalmodulinem.

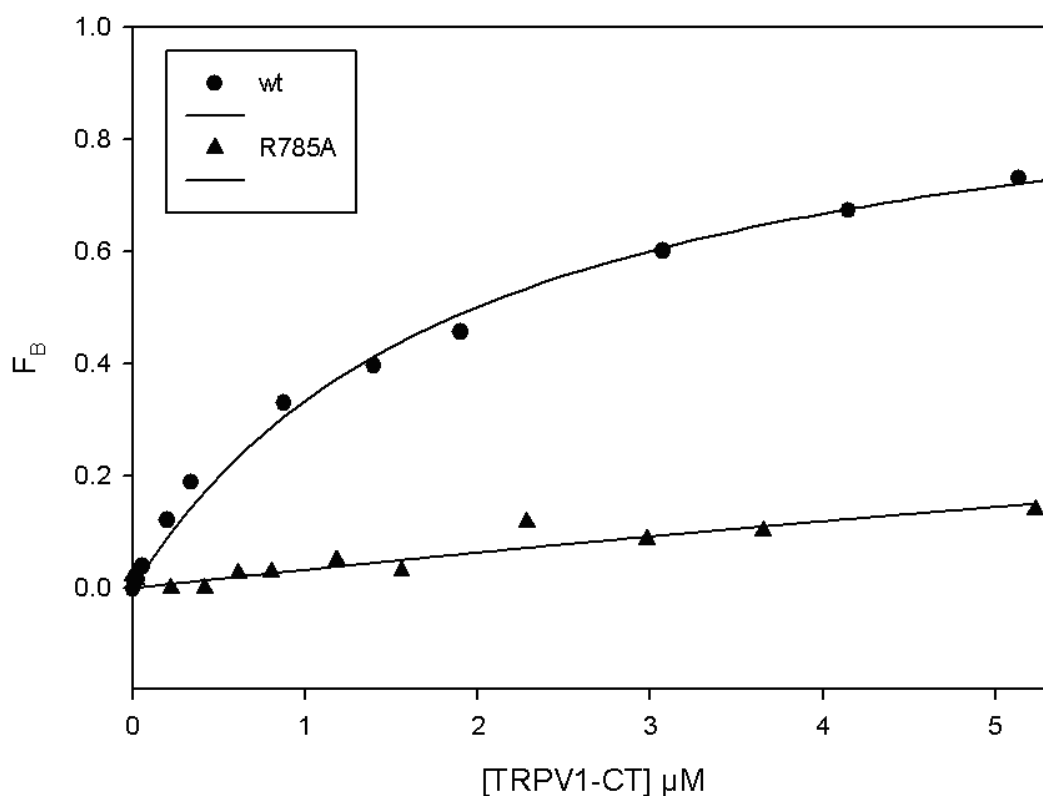
Kompetiční experimenty potvrdily, že kalmodulin označený fluorescenční sondou Alexa Fluor 488 si ponechává stejnou afinitu k TRPV1 – CT jako neoznačený kalmodulin. Hodnota této disociační konstanty K_D pro WT byla $1.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$. Vazba TRPV1-CT/kalmodulin je kalcium dependentní, nedocházelo tedy k interakci v nepřítomnosti Ca^{2+} . K obdobným závěrům dospěl ve své práci i Numazaki et al. (Numazaki, Tominaga et al. 2003).

V této práci jsme tedy sledovali vliv devíti bodových mutací na vazbu izolovaného C- konce TRPV1 a kalmodulinu. Hodnoty disociačních konstant jednotlivých konstruktů s těmito bodovými mutacemi jsou uvedeny v tabulce V.

Tabulka V. Stanovené disociační konstanty pro vazbu TRPV1-CT a Alexa-CaM

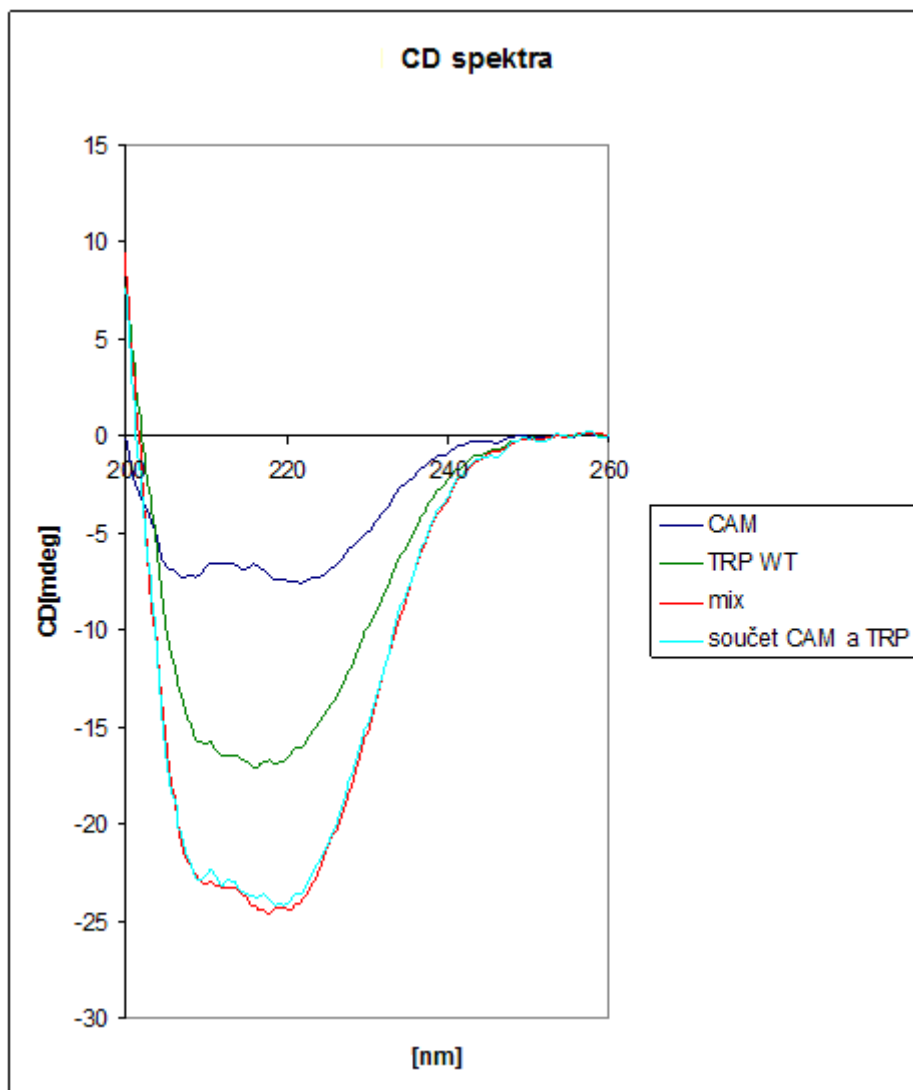
Konstrukt	Disociační konstanty [μM]
WT	1.5 \pm 0.4
R781	0.8 \pm 0.2
R778	1.5 \pm 0.3
L777	2.3 \pm 0.5
K788	3.0 \pm 0.5
R785	29.5 \pm 5.8
R771	10.3 \pm 1.6
R797	9.0 \pm 1.7
V782	1.5 \pm 0.2
V769	3.9 \pm 0.9

Z hodnot naměřených disociačních konstant K_D je zřejmé, že bodové mutace Leu 777 Ala, Arg 778 Ala, Arg 781 Ala a Val 782 Ala neovlivnily v rámci experimentální chyby afinitu C- konce TRPV1 ke kalmodulinu. Naproti tomu konstrukty s mutovanými rezidui Val 769 Ala, Arg 771 Ala, Arg 785 Ala, Lys 788 Ala a Arg 797 Ala vykazovali signifikantně vyšší disociační konstanty. Lze tedy předpokládat, že tyto aminokyselinové zbytky se přímo účastní vazby na kalmodulin. Arg 785 hraje v této interakci významnou roli. U konstruktu s mutovaným Arg 785 Ala jsme zaznamenali nejvyšší efekt na pokles vazebné afinity (obr. 18).



Obr. 18. Titrační křivky měření fluorescenční anisotropie, ukazují vliv mutace Arg 785 Ala C- konce TRPV1 na vazbu Alexa-kalmodulin (▲) v porovnání s WT (●).

Pro ověření možných změn sekundární struktury fúzního proteinu thioredoxin–TRPV1-CT v souvislosti s vazbou na kalmodulinu, bylo provedeno měření cirkulárního dichroismu (CD). Porovnáním CD spekter čistého fúzního proteinu se spektry thioredoxin - TRPV1 – CT a kalmodulinu v molárním poměru 1:1 nebyly potvrzeny žádné změny sekundární struktury v souvislosti s vazbou kalmodulinu na C- konec TRPV1 (obr. 19).

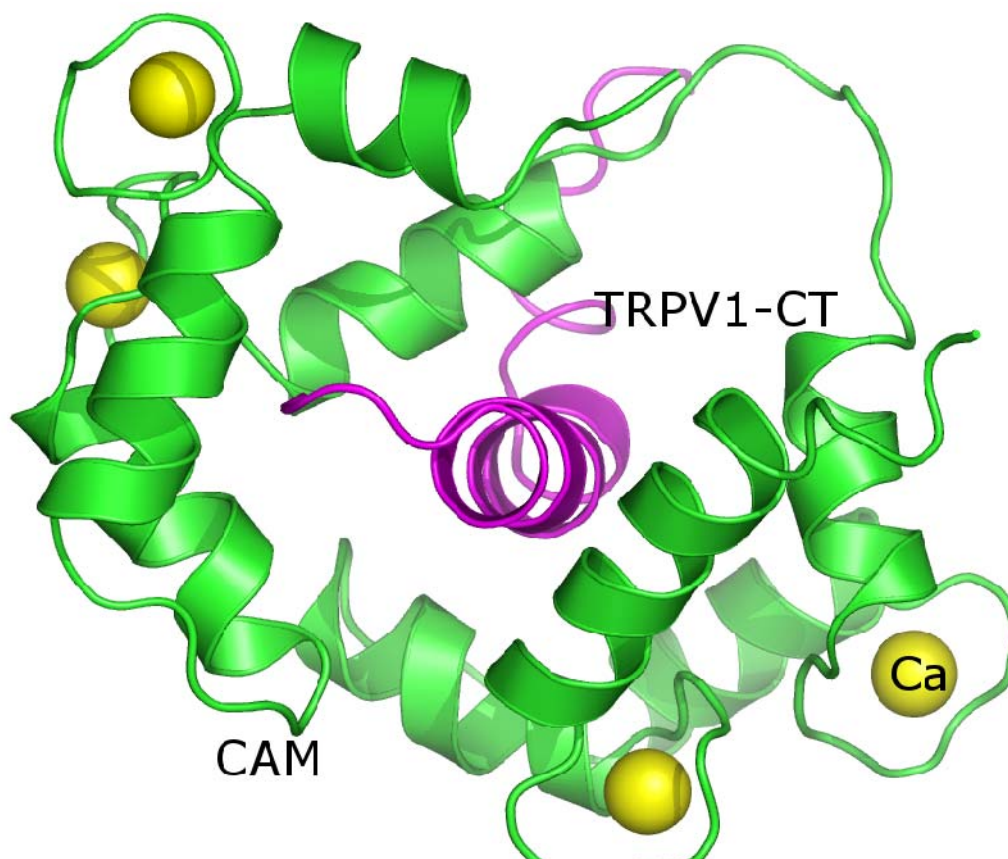


Obr. 19. CD spektra purifikovaného rekombinantního proteinu thioredoxin–TRPV1-CT (modrá), kalmodulinu (zelená) a thioredoxin–TRPV1-CT s kalmodulinem v molárním poměru 1:1 (červená).

5.2.3 Molekulární model C- konce TRPV1 v komplexu s kalmodulinem

Pro získání náhledu výše popsaných interakcí kalmodulin vazebného motivu C- konce TRPV1 a Ca^{2+} - kalmodulinu ze strukturního hlediska, jsme vytvořili homologní počítačový model (obr. 20). Model vazebného motivu pro kalmodulin na C-konci TRPV1 byl vytvořen na základě podobnosti se strukturou kinasy lehkého řetězce

myosinu (myosin light chain kinase - MLCK) (Ikura, Clore et al. 1992) nesoucí 1-8-14 konzervovaný motiv, která vykazovala nejvyšší sekvenční homologii.



Obr. 20. Homologní počítačový model kalmodulin vazebného motivu C- konce TRPV1 (fialová) v komplexu s kalmodulinem. Kalciové ionty jsou zobrazeny žlutě, kalmodulin zeleně.

Typickým rysem vazebné domény pro kalmodulin je α helikální sekundární struktura, která byla identifikována u množství již vyřešených struktur (Rhoads and Friedberg 1997). Dle našeho modelu zaujímá kalmodulin vazebný motiv C- konce TRPV1 také α helikální topologii.

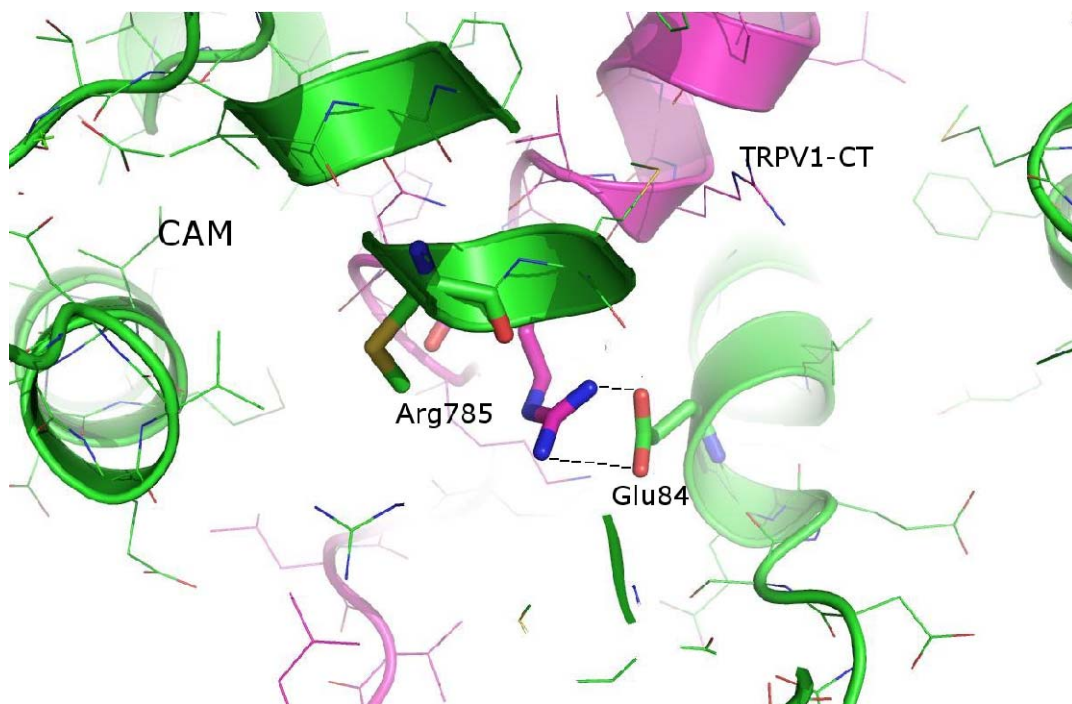
Měřením anizotropie jsme identifikovali několik aminokyselinových zbytků, které se účastní vazebných interakcí. Náš homologní model naznačuje, že v případě bazických reziduí Arg 771, Arg 785 a Lys 788 (obr. 23, 21, 24) jde o interakce s negativně nabitými aminokyselinovými zbytky kalmodulinu, konkrétně Glu 127, Glu 84, Glu 47. Pravděpodobně pro vazbu klíčové jsou van der Waalsovy interakce Arg 785 s Glu 84

(obr. 21). V blízkém okolí Arg 797 se dle našeho modelu nacházejí dva klastry kyselých reziduí kalmodulinu. Vzhledem k velké dynamice této smyčky je spekulativní určit její přesnou polohu. Arg 797 může interagovat s Glu 50, Glu 54, Asp 78 (obr. 22). V případě Arg 771 můžeme předpokládat vodíkové vazby s Glu 14 a Ser11 (kalmodulin) (obr. 23).

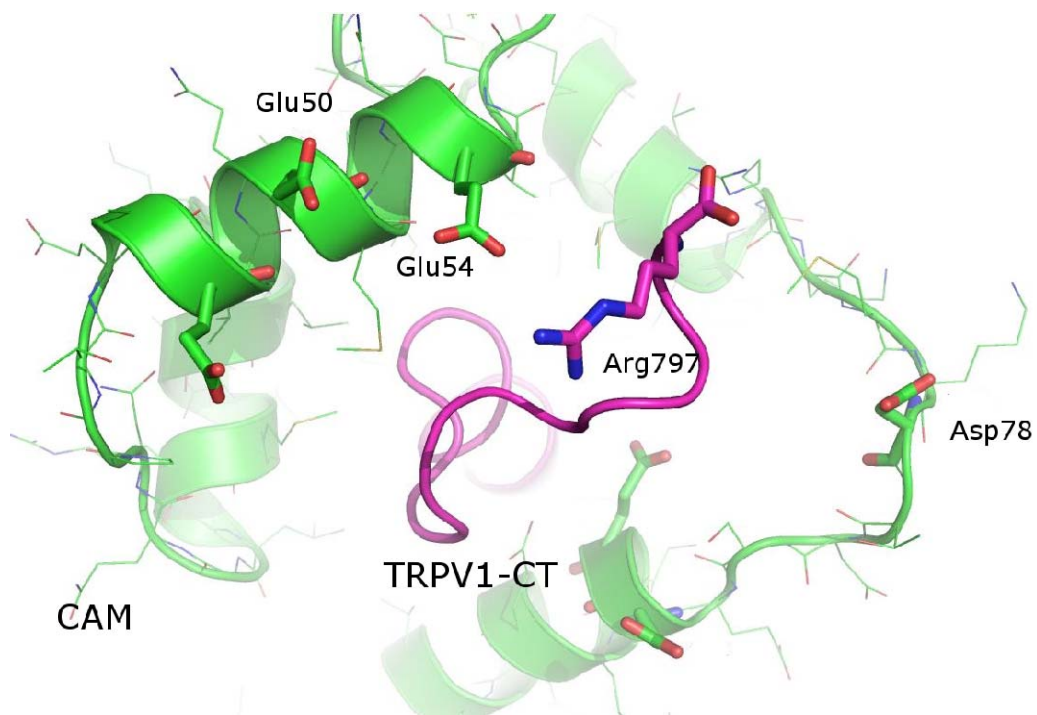
Další aminokyselinový zbytek jehož mutace signifikantně inhibovala vazbu izolovaného C- konce TRPV1 na kalmodulin byl hydrofobní Val 769. Náš homologní počítačový model predikuje jeho interakci s Phe 92 (kalmodulin).

Mutace reziduí Arg 778 and Arg 781 neovlivnila vazbu TRPV1-CT na kalmodulin, což je v souladu s naším modelem, který nepředpokládá žádné specifické polární interakce s kalmodulinem.

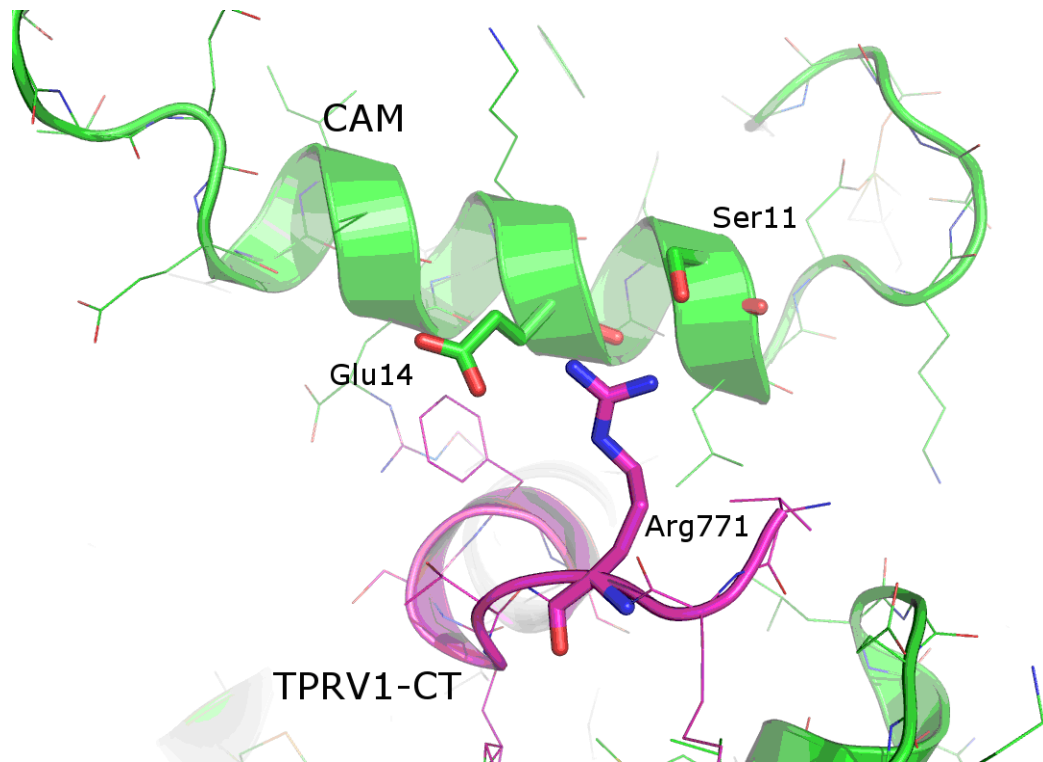
Na základě těchto poznatků se zdá velice pravděpodobné, že kalmodulin interaguje s izolovaným C- koncem TRPV1 obdobným způsobem jako bylo popsáno například v případě MLCK. Tento protein vázající kalmodulin jsme použili jako templát pro homologní modelování. Nicméně v případě TRPV1 hrají významnější roli polární interakce než hydrofobní.



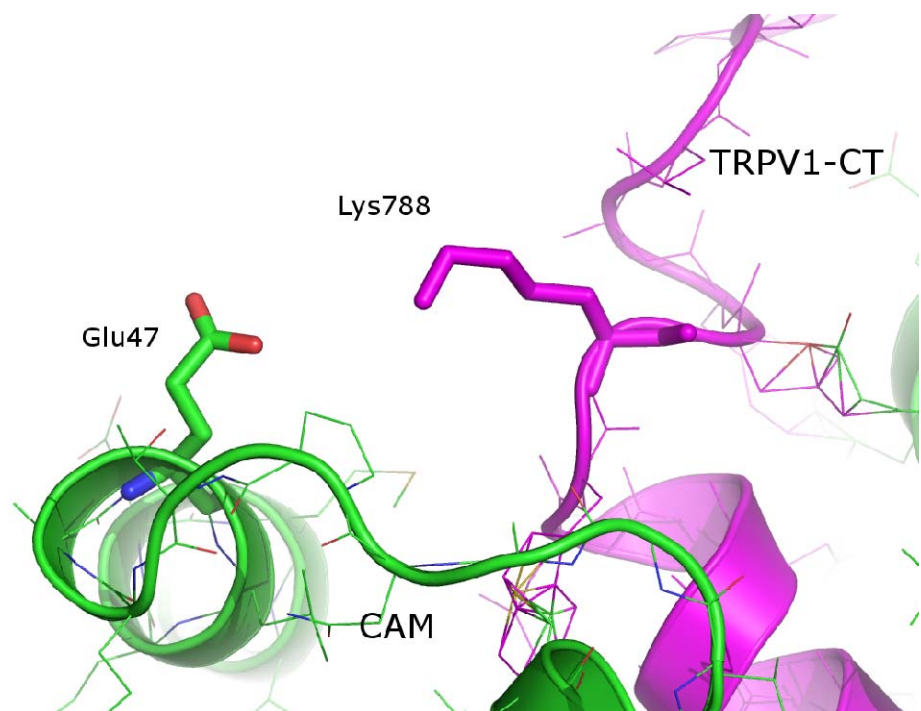
Obr. 21. Pravděpodobně pro vazbu C- konce TRPV1 (fialová) na kalmodulinu (zelená) klíčové van der Waalsovy interakce Arg 785 s Glu 84 jsou vyznačeny přerušovanou čarou.



Obr. 22. Předpokládané interakce C- konce TRPV1 (fialová) s kalmodulinem (zelená). V blízkém okolí Arg 797 se dle našeho modelu nacházejí dva klastry kyselých reziduí kalmodulinu. Vzhledem k velké dynamice této smyčky je spekulativní určit její přesnou polohu. Arg 797 může interagovat s Glu 50, Glu 54, Asp 78.



Obr. 23. Předpokládané interakce C- konce TRPV1 (fialová) s kalmodulinem (zelená). Arg 771 pravděpodobně může vytvářet vodíkové vazby s Glu 14 a Ser11 (kalmodulin).



Obr. 24. Předpokládané interakce C- konce TRPV1 (fialová) s kalmodulinem (zelená).

5.2.4 Diskuse k práci II.

Jak bylo již zmíněno, kalmodulin hraje významnou roli v regulaci řady iontových kanálů včetně členů TRP rodiny (Zhu 2005). V souvislosti s vazbou kalciových iontů podléhá kalmodulin rozsáhlým konformačním změnám (Fallon and Quioco 2003). Díky své velké konformační flexibilitě může kalmodulin interagovat s řadou fyziologicky významných proteinů, které nesou vazebné místo pro kalmodulin, jako jsou například členové TRP rodiny iontových kanálů (Zhu 2005).

Na základě porovnávání sekvencí kalmodulin vazebným míst bylo identifikováno několik kalmodulin vazebných motivů jako jsou IQ motiv, 1-5-10, 1-8-14 a 1-16 (klasifikace byla převzata z Calmodulin Target Database <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>).

Přestože bylo publikováno, že 35 aminokyselin dlouhý úsek C- konce TRPV1 se může vázat na kalmodulin, nebyl zde nalezen žádný z klasických vazebných motivů pro kalmodulin, který by se na této interakci podílel (Numazaki, Tominaga et al. 2003).

Cílem této práce bylo detailně prozkoumat ne zcela klasický vazebný motiv pro kalmodulin na C- konci TRPV1 a nalézt aminokyselinové zbytky, které se přímo účastní vazby na kalmodulin. Za tímto účelem jsme provedli devět bodových mutací z oblasti kalmodulin vazebného místa a na C- konci TRPV1. Největší pokles vazebné afinity jsme zaznamenali při mutaci Arg 785 na Ala. Je tedy zřejmé, že tento aminokyselinový zbytek hraje v interakci kalmodulinu a C- konce TRPV1 velmi významnou roli.

Vazba C- konce TRPV1 na kalmodulin byla sledována detekcí anizotropie fluorescence. Pro tyto experimenty byl použit kalmodulin označený fluorescenční sondou Alexa Fluor 488.

Z devíti sledovaných konstruktů jich pět vykazovalo signifikantně nižší afinitu ke kalmodulinu (tabulka V). Ve čtyřech případech se jednalo o mutaci pozitivně nabitého aminokyselinového zbytku za Ala. Pouze jeden konstrukt s vyšší disociační konstantou byl získán mutací hydrofobní aminokyselinového zbytku. Zbývající čtyři konstrukty nevykazovali v rámci experimentální chyby žádné změny v chování vůči kalmodulinu.

Porovnáním kalmodulin vazebného motivu na C- konci TRPV1 s kalmodulin vazebnými motivy proteinů s vyřešenou strukturou, jsme našli určitou podobnost s proteinem interagujícím s kalmodulinem, kinasou lehkého řetězce myosinu (MLCK). V aminokyselinové sekvenci MLCK byl detekován jeden z klasických kalmodulin vazebných motivů 1-8-14 (Ikura, Barbato et al. 1992). Tento motiv vykazuje určitou podobnost, není však zcela identický. Na pozici 8 kde MLCK nese hydrofobní aminokyselinový zbytek je v případě vazebného motivu pro kalmodulin u TRPV1 nahrazen polárním residuem (Ser 776). Na základě této podobnosti jsme vytvořili homologní počítačový model kalmodulin vazebného motivu C- konce TRPV1 v komplexu s kalmodulinem v konformaci po navázání kalciových kationtů (Obr. 20).

Tento homologní počítačový model kalmodulin vazebného motivu lokalizovaného na C- konci TRPV1 dobře koreluje s výsledky mutagenezních a fluorescenčních experimentů. Čtyři z pěti aminokyselinových zbytků, které se jeví jako esenciální pro vazbu izolovaného C- konce TRPV1 na kalmodulin se účastní iontových či hydrofobních vazebných interakcí predikovaných počítačovým modelem. Zatímco rezidua, jejichž mutace ovlivnila vazbu C- konce TRPV1 na kalmodulin, se nevyskytovala v blízkosti žádných vazebných partnerů v modelu komplexu TRPV1- CT/kalmodulin.

Můžeme se tedy domnívat, že kalmodulin vazebný motiv na C- konci TRPV1 vykazuje obdobné vazebné interakce jako již vykrystalizované struktury nesoucí kalmodulin vazebný motiv (například kalmodulin vazebný motiv na MLCK). Jedním z těchto typických rysů je α helikální struktura vázající se do centrální kavity kalmodulinu, která byla vytvořena změnou konformace kalmodulinu v závislosti na vazbě kalciových iontů. Rozdílným znakem však zůstává převažující význam polárních interakcí naproti dominantní roli hydrofobní vazby v případě vazby kalmodulin vazebného motivu MLCK.

6. ZÁVĚR

Intracelulární oblast C- konce receptoru se významně podílí na přenosu signálů, otevírání kanálu, protein-proteinových interakcí a přenosu těchto molekul. Detailní poznatky o uspořádání terciární struktury této oblasti je významné pro přesné pochopení funkce iontového kanálu.

Prokázali jsme, že na C- konci TRPV1 receptoru je lokalizováno pouze jedno vazebné místo pro ATP. Molekula ATP interaguje s ATP vazebnou doménou Walker A typu. Na této vazbě se významně podílí Lys 735, jehož mutace tuto vazbu zcela inhibovala. Molekula ATP se vazby účastní pouze svojí fosfátovou částí.

Charakterizovali jsme 35 aminokyselin dlouhý segment C- konce TRPV1 receptoru interagující s kalmodulinem. Tato oblast zaujímá α helikální sekundární strukturu a v souvislosti s vazbou nedochází ke změnám konformace.

Identifikovali jsme atypický kalmodulin vazebný motiv. Klíčovou roli při vazbě kalmodulinu hrají iontové interakce. Mutace Arg 785 za Ala způsobila úplnou ztrátu vazebných schopností pro kalmodulin. Byla označena i další rezidua která se na vazbě podílejí, mezi ně patří Arg 771, Arg 797 a Lys 788. Přestože hydrofobní rezidua jsou u řady konsensuálně stanovených motivů považována za klíčová, překvapivě pouze jediný hydrofobní aminokyselinový zbytek se účastní vazby C- konce TRPV1 na kalmodulin.

ATP binding site on the C-terminus of the vanilloid receptor

Lenka Grycova^a, Zdenek Lansky^a, Eliska Friedlova^a, Viktorie Vlachova^a,
Martin Kubala^b, Veronika Obsilova^a, Tomas Obsil^{a,c}, Jan Teisinger^{a,*}

^a Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague, Czech Republic

^b Department of Experimental Physics, Faculty of Science, Palacky University, tř. Svobody, 26 771 46, Olomouc, Czech Republic

^c Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague, Czech Republic

Received 12 April 2007, and in revised form 29 June 2007

Available online 21 July 2007

Abstract

Transient receptor potential channel vanilloid receptor subunit 1 (TRPV1) is a thermosensitive cation channel activated by noxious heat as well as a wide range of chemical stimuli. Although ATP by itself does not directly activate TRPV1, it was shown that intracellular ATP increases its activity by directly interacting with the Walker A motif residing on the C-terminus of TRPV1. In order to identify the amino acid residues that are essential for the binding of ATP to the TRPV1 channel, we performed the following point mutations of the Walker A motif: P732A, D733A, G734A, K735A, D736A, and D737A. Employing bulk fluorescence measurements, namely a TNP-ATP competition assay and FITC labelling and quenching experiments, we identified the key role of the K735 residue in the binding of the nucleotide. Experimental data was interpreted according to our molecular modelling simulations.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: TRP channel; Walker A motif; Steady-state fluorescence; TNP-ATP, FITC

Transient receptor potential channel vanilloid receptor subunit 1 (TRPV1) is a non-selective cation channel, with a preference for Ca²⁺ and Mg²⁺ [1], responsible for heat and chemically evoked pain response. TRPV1, together with more than 30 homologous channels, belongs to the TRP channel family that can be divided into seven subfamilies [1]. TRPV1 is predicted to be composed of six transmembrane segments, a hydrophobic section that lines the pore region between the fifth and sixth transmembrane domains and the intracellular C- and N-terminus. The cytosolic N-terminus [2] contains a Walker B type ATP binding site [3], three ankyrin domains that are known for their ability to interact with calmodulin [4–6], and phosphorylation sites for protein kinase A. A Walker A type ATP binding site [3], calmodulin binding site, phosphorylation site for protein kinase C [7] and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding sites are localized to the intracellular C-terminus. [4,6] It has been reported that

this monomeric subunit probably associates to form a tetrameric structure with a central hydrophilic pore [8,9].

TRPV1 is a thermosensitive ion channel activated by noxious heat (>43 °C) [2,10], low pH (<5.4) and a wide range of other chemical stimuli like capsaicin [2] and its analogs (resiniferatoxin), 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid [11], *N*-arachidonyl dopamine [12,13], anandamide [14] and other arachidonic acid metabolites. There are other stimuli that could play a role in the modulation of TRPV1 ion channel activity. Kwak et al. [3] described the electrophysiological properties of isolated inside-out membrane patches, isolated from sensory neurons, after subsequent additions of capsaicin and ATP. Although ATP by itself does not seem to function as a direct activator, intracellular ATP increases TRPV1 currents [4] by direct interaction with the nucleotide-binding domains, designated the Walker A and Walker B motifs that are homologous to other ATP binding proteins [15–19]. Walker A motif is a conserved glycine-rich sequence of amino acid residues that is known for its ability to bind to ATP [20]. Several variations of this sequence with a constant lysine residue have

* Corresponding author. Fax: +420 241062249.

E-mail address: teisingr@biomed.cas.cz (J. Teisinger).

been reported: **GXXGXXGK** [20], **GXXXXGK** [21], **GXXGXXK** [22]. This particular lysine residue, located in the Walker A motif of ABC transporters, was described as a crucial residue for ATP binding due to its interaction with the γ -phosphate of the nucleotide [24,25].

In this study, we tested the ability of the Walker A motif located on the isolated C-terminus of TRPV1 to bind to ATP. In order to identify the amino acid residues from the Walker A motif that are essential for binding to ATP, site-directed mutagenesis of the following residues was performed: P732A, D733A, G734A, K735A, D736A, and D737A. The ability of these constructs to bind to ATP was tested using a TNP-ATP fluorescence assay [26]. Furthermore, a FITC labelling and quenching assay was employed to verify the results obtained from the TNP-ATP study. A three-dimensional model of the C-terminus of TRPV1 with bound ATP was built using a restraint-based molecular modelling method and all experimental results were compared with this molecular model and interpreted accordingly.

Materials and methods

Fusion protein expression and purification

Chemicals were obtained from Sigma–Aldrich. TNP-ATP and FITC were obtained from Molecular Probes, Invitrogen (Eugene, OR). Pfu-Polymerase, and the deoxyribonucleotide mix were from Stratagene (La Jolla, CA). The restriction endonucleases BamHI and EcoRI were from Fermentas, as was DPNI. Glutathione Sepharose 4B was from Amersham Biosciences (Freiburg, Germany). *Escherichia coli* BL21DE3 cells and JM109 competent cells were from Promega. DNA sequencing was performed on an ABI Prism automated sequencer at the facility of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

The sequence of rat C–tail TRPV1 DNA (amino acids 686–838) subcloned into the pGEX-4T expression vector was used as a template for introducing mutations by PCR. Six point mutations were performed on the wild-type (WT) DNA, namely P732A, D733A, G734A, K735A, D736A, and D737A. Mutagenesis PCRs were performed using PfuUltra High-fidelity DNA Polymerase (Stratagene). All constructs were verified by DNA sequencing.

C-terminus TRPV1 DNA and all its mutations were transformed into BL21 *E. coli* bacteria and cultured at 37 °C to an OD_(600nm) of 0.8. Induction was carried out with 0.5 mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) for 20 h at room temperature. Cells were centrifugated, resuspended (with PBS, 0.5 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.05% Triton-X100), disrupted by sonication and the homogenate was again centrifugated. To avoid impurities, a two-step purification protocol was performed. Affinity chromatography was done according to the manufacturer's standard protocol for glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences). The sample was eluted with 10 mM reduced glutathione (Sigma) pH 8.0 and subsequently dialysed overnight vs. 20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, and 10 mM DTT, 10% Glycerol. Protein concentration using Millipore columns was followed by gel chromatography. The purity was verified using 12% SDS–PAGE. Concentrations were estimated by absorbance measurements at 280 nm.

TNP-ATP binding assay

The fluorescence emission spectrum of TNP-ATP (2',3'-o-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate), a fluorescent analogue of ATP, is dependent on the polarity of its micro-environment [27]. Binding the probe to a hydrophobic protein binding site can therefore be detected as an

increase in the fluorescence intensity [28]. The probe binding assay was performed by subsequent additions of TNP-ATP to pure buffer and protein solutions.

TNP-ATP was dissolved and stored as a 50 μ M stock solution. Titration was performed in 10 consecutive steps; a volume of 0.5 μ l was added in each step for all constructs (i.e. WT, P732A, D733A, G734A, K735A, D736A, and D737A). Fluorescence intensity was measured with a FluoroMax-2 (Jobin Yvon/Spex) steady-state fluorometer in 50 μ l quartz cuvettes. The excitation and emission wavelengths were 462 and 527 nm, excitation and emission band passes were 10 nm and the integration time was 5 s. Samples were diluted to 2 μ M in 20 mM Tris–HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5 for K_D assessment experiments and 24 μ M for assessments of γ .

Assessment of the TNP-ATP dissociation constant

The signal of the free buffer and protein (if present) was recorded before the addition of the fluorescent probe and was subtracted as the background. Corrections for protein and probe dilution were performed and the fluorescence intensity was normalized; the signal of 1 μ M TNP-ATP was set to unity. As has already been shown, there is only a single ATP binding site on the C-terminus of TRPV1 [3]. The dependence of the normalized fluorescence intensity on the total concentration of TNP-ATP was therefore fitted to the following equation describing single-site binding [29].

$$F = [P]_T + \frac{\gamma - 1}{2} \left([P]_T + [E]_T + K_P - \sqrt{([P]_T + [E]_T + K_P)^2 - 4[P]_T[E]_T} \right) \quad (1)$$

where F is the normalized fluorescence intensity, $[P]_T$ is the concentration of TNP-ATP, $[E]_T$ is the concentration of the protein, γ is the fluorescence intensity enhancement factor of the bound probe relative to the free probe, and K_P is the dissociation constant. The factor γ was estimated to be 3.5 ± 1.1 using the approach described in [30]. The value of K_P was estimated by a nonlinear least-squares regression. All parameters except K_P were kept constant during the fitting procedure. As shown previously, the effect of a single point mutation in the binding site on the estimation of the γ parameter can be neglected, because even a large error in the estimation of γ parameter would only moderately influence the dissociation constant for ATP binding [31–33]. Hence, we considered the factor γ to be constant in our experiments.

ATP binding assay

As has already been shown [29], the bulkier TNP-ATP molecule may not bind to the ATP binding site in the same way as the pure ATP molecule. Therefore dissociation constants for TNP-ATP, in general, do not reflect the ability of a protein to bind to ATP, and ATP dissociation constants also need to be assessed. A competition assay between TNP-ATP and ATP was employed for the estimation of ATP dissociation constants. Competition between these two reagents resulted in a lower rate of binding of TNP-ATP to the protein and a decrease in fluorescence intensity. The experimental procedure was the same as for the estimation of TNP-ATP dissociation constants, except for the presence of 20 mM ATP in the measurement buffer. The pH was adjusted to 7.5 after the addition of ATP.

Assessment of the ATP dissociation constant

The signal of the free buffer (containing ATP) and protein (if present) was recorded and subtracted as the background. Corrections for protein and probe dilution were performed and the fluorescence intensity was normalized as described above. The dependence of the normalized fluorescence intensity on the total concentration of TNP-ATP was fitted to the following equation, describing the competition of two ligands for the same binding site [31]:

$$F = [P]_T + \frac{\gamma - 1}{2} \left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} - \sqrt{\left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} \right)^2 - 4[P]_T[E]_T} \right) \quad (2)$$

where $[A]_T$ represents the concentration of ATP and K_A is the dissociation constant for ATP. The TNP-ATP dissociation constant, K_P , was obtained as described above. K_A was estimated by a nonlinear least-squares regression. All parameters except K_A were kept constant during the fitting procedure.

FITC labelling

Both the wild-type (WT) and K735A construct (4.5 μ M), with or without 20 mM ATP, were incubated with 10 μ M FITC (fluorescein-5-isothiocyanate) in a solution containing 20 mM Tris–HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5 for 1 h in the dark at 6 °C. Residual FITC was removed by dialysis overnight against a large excess of 20 mM Tris–HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5. Steady-state fluorescence spectra were measured at room temperature (22 °C) using a FluoroMax-2 (Jobin Yvon/Spex) steady-state fluorometer, in 50 μ l quartz cuvettes. The excitation and emission wavelengths were set to 480 and 520 nm, respectively. Both the excitation and emission band passes were 5 nm, and the integration time was 0.5 s. Fluorescence intensities were normalized so that the mean fluorescence intensity of the sample without ATP was set to unity. The influence of ATP on FITC binding was assessed from FITC-labelled C-terminus emission spectra.

FITC quenching

FITC was quenched with anti-fluorescein (AntiFl). AntiFl quenching experiments were performed in four different setups i.e. WT and K735A, both with and without ATP. FITC-labelled protein samples were titrated with the quencher, the fluorescence intensity was detected and corrected for the probe dilution. The fluorescence intensity was measured at room temperature (22 °C) using a FluoroMax-2 (Jobin Yvon/Spex) steady-state fluorometer, in 50 μ l quartz cuvettes. The excitation and emission wavelengths were set to 480 and 520 nm, respectively. Both the excitation and emission band passes were 5 nm, and the integration time was 0.5 s. The quenching of FITC was evaluated using the Stern–Volmer formula [34]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q], \quad (3)$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of the quencher, respectively, K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant and $[Q]$ is the concentration of the quencher. A linear function was fitted to the Stern–Volmer plot and the quenching constant was estimated using the least squares method [34].

FITC fluorescence decay measurement

Time-resolved analysis of the FITC fluorophor attached to the wild-type (WT) or K735A mutant (both labelled either in the presence or absence of ATP) was performed in order to characterize the nature of the AntiFluorescein quenching mechanism. Decay of FITC fluorescence (3 μ M FITC concentration) was estimated using the time-correlated single-photon counting (TCSPS) method. Data were acquired on fluorometer PicoHarp300 (PicoQuant GmbH, Germany) using the pulsed laser diode centered around 445 nm as a source of excitation light. The repetition frequency was set to 10 MHz, the emitted photons were collected under magic angle and the emission wavelength was set to 520 nm with 8 nm bandpass. The instrument response function (IRF) was estimated by scatterer and setting the monochromator to 445 nm. The FWHM of the IRF was found to be 0.224 ns. Fluorescence decay data were sampled with the count-rate $<1.10^5$ count/s, the data for IRF with count-rate

$<2.10^4$ counts/s to eliminate the pile-up effect. Each histogram was acquired for 180 s at 295 K (bath controlled).

FITC fluorescence decay analysis

The measured data were fitted using the commercial software FluoFit Pro (PicoQuant GmbH, Germany) to the common multiexponential scheme with reconvolution:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t \text{IRF}(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt'$$

The goodness of fit was evaluated by the reduced χ^2 parameter and also by visual inspection of the residuals distribution. Accuracy of the fitted parameters was evaluated by the support plane analysis (built-in modul of the FluoFit Pro), using 95% probability level.

Molecular modelling

A molecular model of the C-terminus of TRPV1 was generated using the restraint-based homology modelling method. The C-terminus part was built using the crystal structure of fragile histidine triad protein (FHIT, PDB code 1FIT) as a template [35]. Sequence homology between the target (TRPV1) and the template (FHIT) is 44% [36]. However, the sequence of FHIT protein does not contain the Walker A motif, which is present in the sequence of the C-terminal part of TRPV1. Therefore, it has been necessary to use other templates to model missing Walker A motif and incorporate it into our model of the C-terminal part of TRPV1. Crystal structures of several ATP-binding cassette (ABC) transporters were used for the modelling of the nucleotide-binding site [37,38]. The Walker A motif was built using the human cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) [19], MalK [16], the transporter associated with antigen processing (TAP1) [17], the ATP-binding subunit of histidine permease (HisP) [15], and MJ0796, a bacterial ABC transporter cassette [18] (pdb codes 1XMJ, 1G29, 1JJ7, 1B0U, 1L2T, respectively). The sequence of the C-terminus of rat TRPV1 (from A689 to T801) was aligned with the template sequences using CLUSTALX 1.81 [39]. The sequence alignment used for modelling is shown in Fig. 1. The three-dimensional model of the C-terminus of TRPV1 was prepared by the Modeller 8v2 program [40].

TRPV1-CT	AQESKNIWKLQRAITILDTEKSFLLKCMKAFKFRSGKLLQUGFTPDGKDDYRMCFRUDEUNW
1FIT	-SFRFGQHLIKPSUFLKTELSEFALUNRKPUPGHLUCPLRPUERFHDLRPDEUADL-F
	. . . : : : . * . * * * . * * . * : * : . * : : . * : : .
1G29	-----GSSGCGKTT-----
	. . . * : * * .
1L2T	-----PSGSGKST-----
	* : * * .
1JJ7	-----GPNGSGKST-----
	* . * * .
1XMJ	-----GSTGAGKTS-----
	* * * * .
1B0U	-----GSSGSGKST-----
	* : * * .
TRPV1-CT	TTMNTNUGIINEDPGNCEGUKRTLFSLSRSGRUSGRNHWKFNALUPLLRDAST
1FIT	QT-TQRUGTVUEK--HFHGT--SLTFSMQDGPAGQTKKHUHUHULPRKAGD
	* . * * : * . : * . : * * * * * : * * . * : . * * .
1G29	-----
1L2T	-----
1JJ7	-----
1XMJ	-----
1B0U	-----

Fig. 1. The sequence alignment of the C-terminus of TRPV1 with the Fragile histidine triad protein (FHIT), whose three-dimensional structure has been recently solved at 1.85 Å resolution (pdb code 1FIT). Walker motif A was modelled according to the following members of the ABC-transporter superfamily: The human Cystic Fibrosis Regulator, MalK, the transporter associated with antigen processing (TAP1), the ATP-binding subunit of Histidine permease (HisP) and MJ0796, a bacterial ABC transporter cassette (pdb codes 1XMJ, 1G29, 1JJ7, 1B0U, and 1L2T, respectively). Identical amino acids are marked with an asterisk. Similar amino acids with the more important groups are indicated with a colon. Dots indicate similar amino acids of the less important groups that are less likely to influence the protein structure.

Ligand structures (ATP and TNP-ATP) were prepared as described previously [41,42]. Ligand charges were computed by the program Antechamber [43]. The docking of these ligands to the C-terminus of TRPV1 was performed using the Dock 5 package [44] and visualized in UCSF Chimera β 1 [45]. The ligands were placed in an arbitrary position in the vicinity of the Walker A motif and the most energetically favourable position was calculated.

In order to estimate the effect of Walker A motif insertion into the sequence of FHIT we also prepared the model of the C-terminus of TRPV1 based only on FHIT template (e.g. without the Walker A motif). The root mean square deviation (R.M.S.D.) between this model and FHIT template was 0.59 Å over 100 C α atoms. The R.M.S.D. between the model with Walker A motif included and FHIT template was 0.63 Å over 102 C α atoms indicating that insertion of Walker A motif did not affect the overall structure of the resulting model.

Results

TNP-ATP binding

The binding of TNP-ATP to the TRPV1 C-terminus in the wild-type and point mutants (P732A, D733A, G734A, K735A, D736A, and D737A) was estimated from the

enhancement of fluorescence intensity compared to a titration of the free probe in solution (Fig. 2). In agreement with previous results [23,29], no binding of TNP-ATP was observed in the presence of the GST protein alone. However, we observed an increase in fluorescence intensity upon the addition of the GST-TRPV1 fusion protein, which suggests the binding of TNP-ATP to the TRPV1 part of the fusion protein. All dissociation constants can, therefore, be assigned to the binding of TNP-ATP to the C-terminus of TRPV1. Based on previously published results, [3] we assumed the existence of only one TNP-ATP binding site on the C-terminus of TRPV1. Using formula 1, the dissociation constant K_D for TNP-ATP binding to the wild-type C-terminus of TRPV1 was estimated to be $1.01 \pm 0.16 \mu\text{M}$. We found that mutations G734A, K735A, and D736A did not alter the binding of TNP-ATP, within the range of experimental error. The estimated dissociation constants for these constructs are $9.7 \pm 6.8 \mu\text{M}$, $2.12 \pm 0.34 \mu\text{M}$, and $2.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$, respectively. On the other hand, mutation D733A increased the value of the dissociation constant to $16 \pm 7 \mu\text{M}$, suggesting a decrease in TNP-ATP binding. Finally, there was no observable binding of TNP-ATP to the P732A and D737A mutants. All dissociation constants for the binding of TNP-ATP to all constructs are summarized in Table 1. All values are presented as means \pm SEM (standard error of the mean) from at least three independent measurements.

ATP binding

ATP binding to TRPV1 C-terminus constructs was estimated from competition experiments, where both ligands (ATP and TNP-ATP) were present in the solution, resulting in a relative decrease in fluorescence intensity compared to the titration of TNP-ATP alone (Fig. 2). This intensity decrease indicated that a fraction of the nucleotide-binding sites were occupied by the ATP molecules, which allowed us to compute the dissociation constants for ATP binding. As shown previously [e.g. 3,46,30,47], the dissociation constant for ATP is about three orders of magnitude higher than the dissociation constant for TNP-ATP. This could

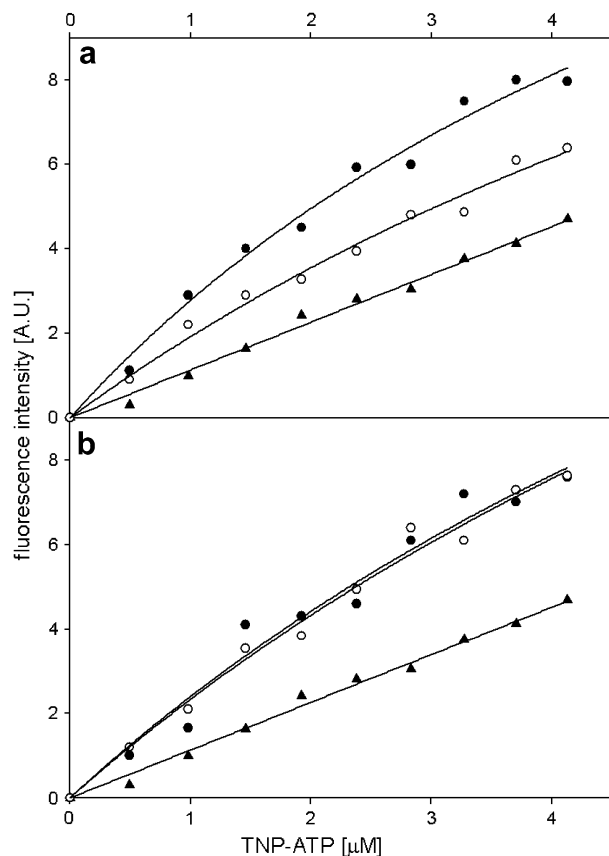


Fig. 2. TNP-ATP binding to wild-type TRPV1 C-terminus (panel a) and the K735A mutant (panel b). The titration of TNP-ATP into protein samples (filled circles) resulted in an increase in fluorescence intensity, compared to when the fluorescent dye was titrated into the pure buffer (triangles), suggesting the binding of TNP-ATP to the C-terminus of TRPV1. Similar experiments were performed with ATP present in the protein sample (open circles). The relative decrease in fluorescence intensity compared to the situation without ATP is due to competition between the ATP and TNP-ATP molecules.

Table 1
Summary of dissociation constants for ATP and TNP-ATP binding to the C-terminus of TRPV1

Construct	$K_{\text{TNP-ATP}}$ (μM)	K_{ATP} (mM)
WT-stop	1.01 ± 0.16	5.3 ± 2.1
P732A	>100	N.A.
D733A	16 ± 7	9.6 ± 5.4
G734A	9.7 ± 6.8	3.9 ± 2.1
K735A	2.12 ± 0.34	>100
D736A	2.5 ± 0.9	2.4 ± 1
D737A	>100	N.A.

Dissociation constants were obtained by fitting titration curves (e.g. Fig. 2) to formulae (1) and (2). All experimental values are presented as the mean \pm standard error of the mean from at least three independent measurements. N.A., not analysed.

be the result of the different positioning of the TNP-ATP molecule in the ATP-binding pocket and/or further stabilization of the complex through interaction with the trinitrophenyl moiety, as hypothesized elsewhere [29,31,33,51,52]. Using formula 2, the dissociation constant for ATP binding to the wild-type C-terminus of TRPV1 was estimated to be 5.3 ± 2.1 mM. Notably, variation of ATP-concentration in the measurement buffer (10, 15 or 20 mM) had no systematic influence on the estimated dissociation constant, suggesting that the single-site competitive model is appropriate. The mutations of D733, G734, and D736 resulted in no change in ATP binding within the experimental error of our measurements. The corresponding dissociation constants are 9.6 ± 5.4 mM, 3.9 ± 2.1 mM, and 2.4 ± 1 mM, respectively ATP binding was strongly suppressed by the K735A mutation. The K735A titration curve was hardly distinguishable from titration in the absence of ATP (Fig. 2) and the dissociation constant could therefore only be roughly estimated to be >100 mM. ATP binding was not estimated for the P732A and D737A constructs due to the complete inability of these constructs to bind TNP-ATP. Dissociation constants for the binding of ATP to all constructs are summarized in the Table 1. The goodness of fit was estimated by the inspection of residuals distribution and confirms that the single-site competitive binding model is correct for the estimation of ATP dissociation constant. All values are presented as means \pm SEM (standard error of the mean) from at least three independent measurements. Our competitive method for the assessment of K_D for ATP requires only two quite general assumptions—(i) there is a single binding site on the protein where ATP or TNP-ATP could bind, and (ii) the TNP-ATP and ATP cannot occupy this binding site together (i.e. both are bound in one moment). If these conditions are satisfied, we are able to calculate the K_D for ATP also from the experiment, where the TNP-ATP was displaced only incompletely (Eq. (2)). The method was extensively discussed in Ref. [31] of the manuscript. Of course, as the equilibrium is dynamic, much higher ATP concentration could result in almost complete TNP-ATP displacement. Nevertheless, there are some practical limitations, as the need for ATP solution buffering, which could seriously increase the ionic strength of the solution, and consequently, influence the protein conformation.

Labelling with FITC

The fluorescence of the FITC-labelled WT C-terminus of TRPV1 was analysed in order to confirm the hypothesis that the K735 residue is involved in ATP binding. FITC is known to label the lysine residues [48,49]. In order to verify that some binding sites for FITC are occupied by ATP molecules, we performed labelling experiments with WT TRPV1 and K735A mutant, both in the presence and absence of ATP. Measurement of the absorbance at 280 and 488 nm revealed that the protein were labelled in the

FITC:protein molar ratio 0.56:1 for WT, 0.61:1 for WT-ATP, 0.30:1 for K735A and 0.42:1 for K735A + ATP. The influence of ATP on FITC fluorescence was tested in the absence of any protein and turned out to be negligible (data not shown).

FITC quenching

FITC-labelled constructs were quenched with AntiFl, the quenching was analysed using formula 3. The Stern–Volmer coefficients were determined by a least squares linear fitting procedure. These coefficients reflect the ability of the fluorophore to be quenched. AntiFl quenching experiments were performed in four different setups i.e. WT and K735A, both with and without ATP. With the small amount of data obtained, it was not possible to use analysis of variance as the statistical tool, and so the estimated Stern–Volmer constants were analysed using the *t*-test for one group being formed by the WT and the other one by the WT + ATP, K735A, and K735A + ATP. The Stern–Volmer quenching constant of the WT was significantly lower ($p = 0.04$). The results of the quenching experiments are summarized in Table 2 (Stern–Volmer quenching constants).

FITC fluorescence decay measurement

Fluorescence decay of the FITC attached to the WT, WT + ATP, K735A, and K735A + ATP was measured in the presence or absence of the AntiFl quencher. All fluorescence decay curves were satisfactorily fitted by 3-exponential model with fluorescence lifetimes around 3.9, 1.8, and 0.4 ns (Table 3). All fits were characterized by the χ^2 near 1.00 and random distribution of residuals for all data points, revealing that the used model with estimated parameters correctly describes measured data (Fig. 3). Notably, presence of the AntiFl quencher altered the decay scheme in neither case. This behaviour is characteristic for the static quenching.

Molecular modelling

In order to get structural insight of possible interactions between the C-terminus of TRPV1 and ATP we have used

Table 2
Stern–Volmer quenching constants of FITC-labelled wild-type TRPV1 and the K735A mutant in the presence and absence of ATP in the measurement buffer

	Quenching constant (ml/ μ g)
WT	0.35 ± 0.03
WT + ATP	0.85 ± 0.05
K735A	0.62 ± 0.04
K735A + ATP	0.65 ± 0.05

Stern–Volmer constants were obtained by fitting formula (3) to the Stern–Volmer plot. All experimental values are presented as the mean \pm standard error of the mean from at least three independent measurements.

Table 3
Fluorescence decay parameters of the best 3-exponential fits for the FITC labelled proteins

Sample	α_1	τ_1 (ns)	α_2	τ_2 (ns)	α_3	τ_3 (ns)	χ^2
WT	0.54 <0.52;0.56>	3.88 <3.85;3.92>	0.26 <0.25;0.28>	1.88 <1.63;2.05>	0.19 <0.18;0.21>	0.47 <0.40;0.53>	0.976
WT + AntiFl	0.56 <0.53;0.58>	3.88 <3.84;3.92>	0.26 <0.24;0.27>	1.83 <1.67;2.04>	0.18 <0.17;0.20>	0.43 <0.36;0.51>	0.946
WT – ATP	0.41 <0.38;0.43>	3.86 <3.80;3.92>	0.28 <0.26;0.30>	1.78 <1.61;1.92>	0.31 <0.29;0.34>	0.43 <0.38;0.48>	0.944
WT – ATP + AntiFl	0.44 <0.40;0.46>	3.85 <3.80;3.92>	0.28 <0.26;0.30>	1.71 <1.51;1.94>	0.28 <0.25;0.31>	0.38 <0.31;0.46>	0.929
K735A	0.37 <0.32;0.41>	3.84 <3.75;3.97>	0.32 <0.29;0.35>	1.68 <1.45;2.00>	0.31 <0.26;0.35>	0.40 <0.30;0.51>	0.859
K735A + AntiFl	0.36 <0.28;0.41>	3.95 <3.82;4.17>	0.32 <0.28;0.36>	1.87 <1.54;2.31>	0.32 <0.27;0.36>	0.45 <0.33;0.57>	0.842
K735A – ATP	0.22 <0.22;0.24>	3.84 <3.79;3.90>	0.28 <0.28;0.31>	1.60 <1.49;1.71>	0.49 <0.49;0.53>	0.41 <0.38;0.44>	0.968
K735A – ATP + AntiFl	0.23 <0.21;0.25>	3.90 <3.83;3.97>	0.27 <0.26;0.29>	1.63 <1.50;1.78>	0.49 <0.48;0.52>	0.41 <0.38;0.44>	0.934

Lifetime of each component is denoted by τ_i , and corresponding pre-exponential factor by α_i . Goodness of fit is represented by χ^2 . Numbers in parentheses represent the 95% confidence interval for each parameter. “ATP” in sample description means that the protein was labelled in the presence of ATP, “AntiFl” denotes that the fluorescence decay was estimated in the presence of the AntiFluorescein quencher (3 $\mu\text{g/ml}$).

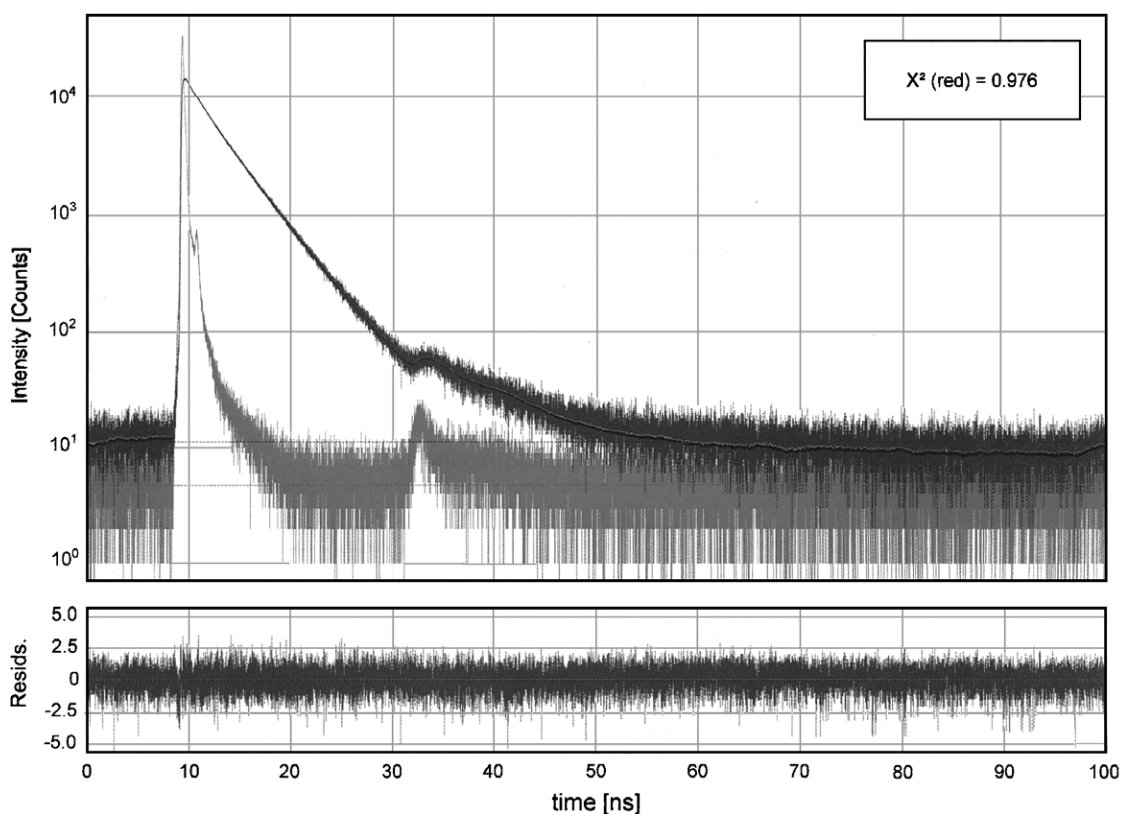


Fig. 3. Fluorescence decay of FITC bound to wild-type protein and instrument response function (IRF). Solid line represents the best 3-exponential fit of the data; bottom panel displays the distribution of residuals.

molecular modelling to build a model of this domain with bound ATP. A model of the C-terminus of TRPV1 (sequence A682-T801) was created using a restraint-based comparative modelling approach. The overall geometry of the final model was determined using the ProCheck web interface [50]. It has 84.8% of the residues in the most

favoured regions of the Ramachandran plot and an acceptable geometry. The overall g factor of the obtained structure was -0.31 . The g factor should be above -0.5 , and values below -1.0 may need investigation. Automated docking of ATP and TNP-ATP molecules into the predicted C-terminus of TRPV1 binding site using the Dock

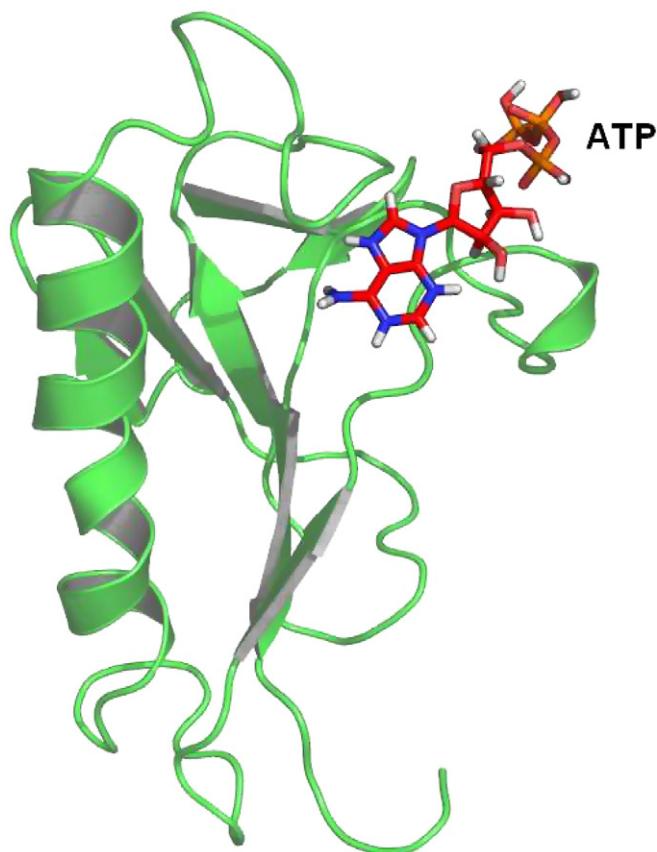


Fig. 4. Molecular model of the C-terminus of TRPV1 with the docked ATP molecule. The Fragile histidine triad protein (FHIT, pdb code 1FIT) was used as a template. The FHIT protein exhibits 40% similarity to the TRPV1 C-terminus, but does not contain Walker A motif, which was therefore modelled according to structures from the ABC transporter family (pdb codes 1XMJ, 1G29, 1JJ7, 1B0U, and 1L2T).

5 program [44] was used to model the structure of ATP and TNP-ATP complexes. Fig. 4 shows the final model of the C-terminus of TRPV1 (A682–T801) with bound ATP. Detailed view of interactions between residues from Walker A motif and ATP and TNP-ATP, respectively, is shown in Fig. 5. As can be seen, our model predicts that the residue K735 is directly involved in ATP binding (its side-chain interacts with β and γ phosphates of ATP). This prediction is in agreement with our mutagenesis data where the replacement of K735 to Ala caused complete inhibition of ATP binding.

Discussion

In this work, we studied the ability of the Walker A motif located on the isolated C-terminal domain of TRPV1 to bind to ATP. Interplay between site-directed mutagenesis, fluorescence spectroscopy and molecular modelling was used to identify the amino acid residues from Walker A motif that are essential for ATP binding. Previously published model of C-terminal part of TRPV1 was built using the homology with the recently crystallized FHIT protein and lacked

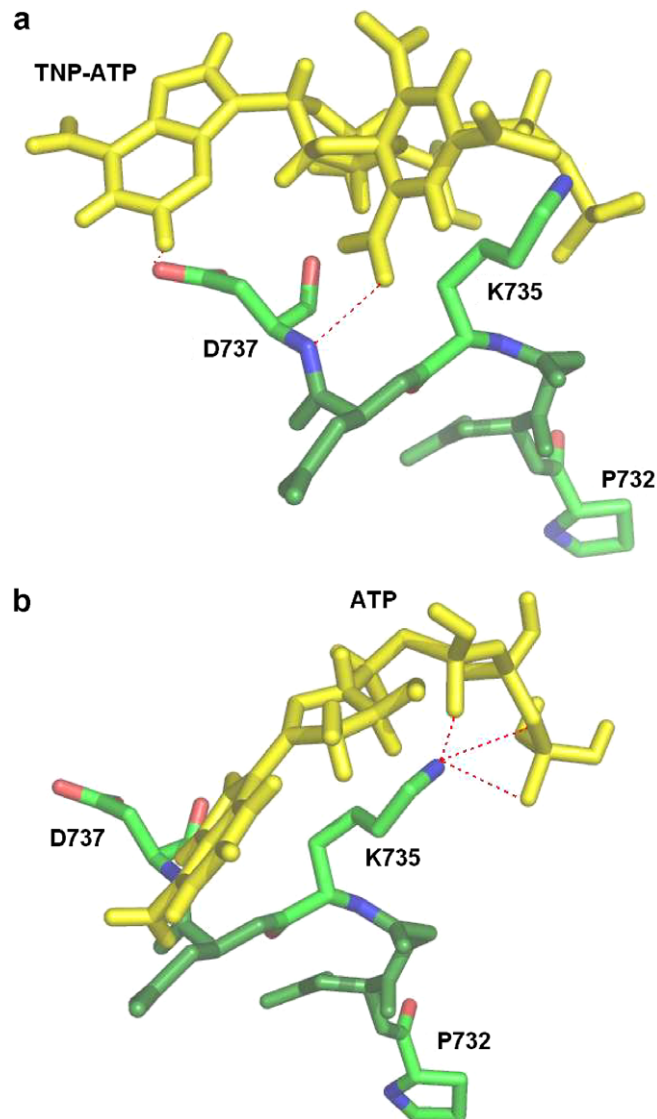


Fig. 5. Isolated section of the Walker A ATP binding site. (a) Segment of five amino acid residues (P732–D737) with a docked molecule of TNP-ATP. Crucial residues for TNP-ATP binding are highlighted. The predicted essential role of D737 in TNP-ATP binding is in agreement with our experimental results. Proposed interactions are depicted using dashed lines. (b) A molecule of ATP interacts with the K735 amino acid residue via the γ -phosphate. Our experiments show that the K735 mutation completely abolishes the ATP binding ability of the C-terminus of TRPV1.

three-dimensional information about the Walker A motif [37]. In order to improve our model we used the structure of the FHIT protein together with several structures of ATP-binding cassette proteins as templates to build a new model with Walker A motif modelled in a more realistic way (Fig. 4). To predict possible interactions between the Walker A motif and ATP, the flexible docking with ATP and TNP-ATP was performed (Fig. 5).

The ATP binding abilities of TRPV1 C-terminus point mutants (expressed as GST fusion proteins) were tested by means of TNP-ATP competition assay. For the wild-type sequence of the TRPV1 C-terminus–GST fusion protein we estimated the dissociation constants to be

$1.01 \pm 0.16 \mu\text{M}$ and $5.3 \pm 2.1 \text{ mM}$ for TNP-ATP and ATP binding, respectively. The latter value fits the value estimated previously (3.3 mM) from electrophysiological experiments, within experimental error [3]. The mutation of G734 and D736 neither affected TNP-ATP nor ATP binding to the TRPV1 C-terminus, within experimental error (Table 1). The D733A point mutation caused a slight change in the binding of TNP-ATP, and did not affect the binding of ATP, within the error of our measurements (Table 1). There is no evidence, based on our molecular model, of an either direct or indirect influence of this residue on TNP-ATP binding and we do not predict any interactions between the ligand and this residue. However, different behaviour was detected with the K735A mutant. The mutation of K735 resulted in a strong inhibition of ATP binding, whereas the dissociation constant for TNP-ATP was not affected at all (Table 1). Observation that mutation affects only the ATP and not the TNP-ATP binding is rare, but such an observation was already described for another protein [33]. In fact, only this kind of observation can alert us that the adenosine-5'-triphosphate moiety of pure ATP and TNP-ATP does not have identical position within the nucleotide-binding site. Difference in interactions should be attributed to the presence of the trinitrophenyl group. First, the TNP-ATP is more bulky than the pure ATP, therefore there might be some sterical hindrance affecting the proper positioning within the binding pocket. Alternatively, one may speculate about some specific interactions between the trinitrophenyl ring and protein, thus making adenosine-5'-triphosphate interaction to protein less important.

In silico docking of ATP predicted a direct interaction between the β and γ -phosphates of ATP and the side-chain of the K735 residue, which are 2.9 and 3.0 Å, respectively, apart (Fig. 5). This prediction supports previously published results on the direct interaction of the ATP γ -phosphate and the conserved lysine residue within the Walker A motif of RAD51D [24]. In order to verify the necessity of the K735 residue for ATP binding, labelling with FITC and quenching with AntiFl were performed. The isothiocyanate reactive group can, in principle, label any Lys residue on the protein that is accessible from the solvent. Nevertheless, steric accessibility, involvement of Lys in other structural interaction (such as salt bridges) or the interaction of the fluorescein moiety with other residues in the vicinity of the reactive amine can substantially influence the binding affinity to each individual Lys residue. In all cases, we observed that the final labelling ratio was lower than 1:1 (FITC:protein), and it is therefore reasonable to assume that only the lysine with the best reactivity is labelled. Apparently, the fact that we were able to label also the K735A mutant reveals that more than one Lys residue could be, in principle, labelled by FITC. However, after K735A mutation the labelling efficiency decreased almost 2-fold, suggesting that Lys735 has the highest affinity to FITC, and is therefore preferentially labelled. The aromatic system of fluorescein can probably mimic the aromatic ring

of ATP, and it has been shown that FITC preferentially occupies the ATP-binding pocket of P-type ATPases [53–55]. In fact, the Stern–Volmer quenching constant $K_{SV} = 0.35 \pm 0.03 \text{ ml}/\mu\text{g}$ obtained from the quenching of FITC bound to the wild-type C-terminus of TRPV1 in the absence of ATP, reflects the fact that the labelled residue is not easily accessible to the quencher. Evaluation of the Stern–Volmer quenching constants for the FITC attached to the wild-type or K735A, both labelled either in the presence or absence of ATP, provides four important observations: (i) There is a difference in K_{SV} for WT and K735A, suggesting that different residue was labelled in each construct; (ii) There is no difference in K_{SV} for the K735A in the absence of ATP and in its presence, suggesting that ATP has no effect on the K735A mutant; (iii) Contrary for the WT, there is a big difference in K_{SV} 's for the labelling in the absence of ATP and for the labelling in its presence, which means that ATP binding prevents FITC binding to K735; (iv) The K_{SV} for the WT labelling in the presence of ATP is different from the K_{SV} 's obtained for the K735A mutant, suggesting that another lysine residue was labelled. It is very likely that ATP-binding induces also some conformational changes of the WT protein, which hinder labelling of the Lys residue that was labelled in the K735A mutant, on the other hand some other lysine becomes exposed for labelling. Taken together, there is evidence that ATP-binding prevents labelling of K735, and moreover, that ATP presence induces conformational changes of the WT but not of the K735A mutant. This is in agreement with results from our TNP-ATP experiments, which revealed that the binding of ATP to the K735A mutant is quite poor.

The complete inability of the P732A and D737A mutants to bind TNP-ATP prevented us from assessing their roles in ATP binding (Table 1) via the TNP-ATP competition assay. Due to the different positioning of the ATP and TNP-ATP molecules in the ATP binding site, the distance between the D737 residue and the Meissenheimer complex of the TNP-ATP molecule is only 0.2 nm. We can thus hypothesize the existence of a hydrogen bond between the Asp 737 hydroxyl group and adenine amino group of TNP-ATP, which stabilizes TNP-ATP in the ATP binding pocket (Fig. 5). According to our molecular model of the C-terminus of TRPV1, we do not predict a crucial role for D737 in nucleotide binding. However, the inability of the D737A mutant to bind TNP-ATP prevented experimental verification of this observation using our approach. On the other hand, we can also hypothesize that the mutation of P732 substantially influenced the overall structure of the ATP binding pocket. This residue probably forces the peptidic backbone containing the crucial residues for ATP and TNP-ATP binding, i.e. K735 and D737, to adopt the right conformation for ligand recognition. P732, which is almost 1.1 nm away from the ATP molecule, is thus involved in the ATP binding process only indirectly by maintaining the proper shape of the ATP binding site.

It has already been published that the adenine moiety of the ATP molecule interacts with the ABC transporter's aromatic residues via a π - π interaction [37]. However, our TRPV1 C-terminus model does not contain any appropriately orientated aromatic amino acids that would suggest this interaction. Based on our molecular model, we can therefore only predict the interaction of the phosphate part of the ATP molecule with the C-terminus of TRPV1.

In conclusion, we have shown in several ways via fluorescence experiments that the K735 residue from the Walker A motif of the TRPV1 C-terminus is involved in the binding of ATP. It can also be seen from the *in silico* docking experiments that the K735 residue interacts with the γ -phosphate of the ATP molecule directly, in agreement with previously published results [24,25]. Moreover, it was shown that the P732 and D737 residues are necessary for the binding of TNP-ATP. Both the TNP-ATP binding experiments and the molecular modelling revealed that ATP and TNP-ATP molecules adopt different positions within the ATP binding site.

Acknowledgments

This work was supported by Grants GAAV IAA600110701, GACR 309/04/0496, 303/07/0915, 305/06/0319, 203/07/0564, Research Project MSM 6198959215, Research Project No. AVOZ 50110509 and Centre for Neurosciences No. LC554. We thank Dr. Robert W. Gereau of Baylor College of Medicine, Houston, TX for providing us with rat TRPV1 C-terminus cDNA in pGEX-4T.

References

- [1] S.F. Pedersen, G. sianik, B. Nilius, *Cell Calcium* 38 (2005) 233–252.
- [2] M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, *Nature* 389 (1997) 816–824.
- [3] J. Kwak, M.H. Wang, S.W. Hwang, T.-Y. Kim, S.-Y. Lee, U. Oh, *J. Neurosci.* 20 (22) (2000) 8298–8304.
- [4] M. Tominaga, T. Tominaga, *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 451 (2005) 143–150.
- [5] T. Rosenbaum, A. Gordon-Shaag, M. Munari, S.E. Gordon, *J. Gen. Physiol.* 123 (2004) 53–62.
- [6] A. Ferrer-Montiel, C. Garcia-Martinez, C. Morenilla-Palao, N. Garcia-Sanz, A. Fernandez-Carvajal, G. Fernandez-Ballester, R. Planells-Cases, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1820–1826.
- [7] M. Numazaki, T. Tominaga, H. Toyooka, M. Tominaga, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 13375–13378.
- [8] D.E. Clapham, L.W. Runnels, C. Strübing, *Nature rev.* 2 (2001) 387–396.
- [9] N. Keddi, T. Szabo, J.D. Lile, J.J. Treanor, Z. Olah, M.J. Iadarola, P.M. Blumberg, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28613–28619.
- [10] M. Tominaga, M.J. Caterina, A.B. Malmberg, T.A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B.E. Raumann, A.I. Basbaum, D. Julius, *Neuron* 21 (1998) 531–543.
- [11] S.W. Hwang, H. Cho, J. Kwak, S.Y. Lee, C.J. Kang, J. Jung, S. Cho, K.H. Min, Y.G. Suh, D. Kim, U. Oh, *PNAS* 97 (2000) 6155–6160.
- [12] S.M. Huang, T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J.M. Walker, V. Di Marzo, *PNAS* 99 (2002) 8400–8405.
- [13] M.J. Caterina, D. Julius, *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001) 487–517.
- [14] P.M. Zygmunt, J. Petersson, D.A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius, E.D. Hogestatt, *Nature* 400 (1999) 452.
- [15] L.W. Hung, I.X. Wang, K. Nikaido, P.Q. Liu, G.F. Ames, S.H. Kim, *Nature* 396 (6712) (1998) 703–707.
- [16] K. Diederichs, J. Diez, G. Greller, C. Müller, J. Breed, C. Schnell, C. Vonrhein, W. Boos, W. Welte, *EMBO J.* 19 (22) (2000) 5951–5961.
- [17] R. Gaudet, D.C. Wiley, *EMBO J.* 20 (17) (2001) 4964–4972.
- [18] P.C. Smith, N. Karpowich, L. Millen, J.E. Moody, J. Rosen, P.J. Thomas, J.F. Hunt, *Mol. Cell.* 10 (1) (2002) 139–149.
- [19] H.A. Lewis, X. Zhao, C. Wang, J.M. Sauder, I. Rooney, B.W. Noland, D. Lorimer, M.C. Kearins, K. Connors, B. Condon, P.C. Maloney, W.B. Guggino, J.F. Hunt, *S. Emtage, J. Biol. Chem.* 280 (2) (2005) 1346–1353.
- [20] J.E. Walker, M. Saraste, M.J. Runswick, N.J. Gay, *EMBO J.* 1 (8) (1982) 945–951.
- [21] W.J. Driscoll, K. Komatsu, C.A. Stofy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (92) (1995) 12328–12332.
- [22] C. Satishchandran, Y.N. Hickman, G.D. Markham, *Biochemistry* 31 (1992) 11648–11688.
- [23] S. Jha, N. Karnani, S.K. Dhar, K. Mukhopadhyay, S. Shukla, P. Saini, G. Mukhopadhyay, R. Prasad, *Biochemistry* 42 (2003) 10822–10832.
- [24] C. Wiese, J.M. Hinz, R.S. Tebbs, P.B. Nham, S.S. Urbin, D.W. Collins, L.H. Thompson, D. Schild, *Nucleic Acids Res.* 34 (9) (2006) 2833–2843.
- [25] R.M. Story, I.T. Weber, T.A. Steitz, *Nature* 355 (1992) 318–325.
- [26] T. Hiratsuka, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 3479–3485.
- [27] T. Hiratsuka, *Biochem. Biophys. Acta* 453 (1976) 293–297.
- [28] E.G. Moczydlowski, P.A.G. Fortes, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 2346–2356.
- [29] M. Kubala, J. Plasek, E. Amler, *Eur. Biophys. J.* 32 (4) (2003) 363–369.
- [30] M. Kubala, K. Hofbauerova, R. Ettrich, V. Kopecky Jr., R. Krumscheid, J. Plasek, J. Teisinger, W. Schoner, E. Amler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002) 154–159.
- [31] M. Kubala, J. Plasek, E. Amler, *Physiol. Res.* 53 (2004) 109–113.
- [32] M. Kubala, J. Teisinger, R. Ettrich, K. Hofbauerova, V. Kopecky Jr., V. Baumruk, R. Krumscheid, J. Plasek, W. Schoner, E. Amler, *Biochemistry* 42 (21) (2003) 6446–6452.
- [33] Z. Lansky, M. Kubala, R. Ettrich, M. Kutý, J. Plasek, J. Teisinger, W. Schoner, E. Amler, *Biochemistry* 43 (26) (2004) 8303–8311.
- [34] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third ed., Springer, New York, 2006, pp. 240–242.
- [35] V. Vlachova, J. Teisinger, K. Susankova, A. Lyfenko, R. Ettrich, L. Vyklický, *J. Neurosci.* 23 (4) (2003) 1340–1350.
- [36] C.D. Lima, K.L. D'Amico, I. Naday, G. Rosenbaum, E.M. Westbrook, W.A. Hendrickson, *Structure* 5 (1997) 763–774.
- [37] S.V. Ambudkar, I.-W. Kim, D. Xia, Z.E. Sauna, *FEBS Lett.* 580 (2005) 1049–1055.
- [38] M. Dean, A. Rzhetsky, R. Allikmets, *Genome Res.* 11 (2001) 1156–1166.
- [39] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [40] A. Šali, T.L. Blundell, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779–815.
- [41] R. Krumscheid, R. Ettrich, K. Susankova, Z. Lansky, K. Hofbauerova, H. Linnertz, J. Teisinger, E. Amler, W. Schoner, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3923–3936.
- [42] R. Ettrich, M. Melicherčík, J. Teisinger, O. Ettrichova, R. Krumscheid, K. Hofbauerova, P. Kvasnicka, W. Schoner, E. Amler, *J. Mol. Model.* 7 (2001) 184–192.
- [43] J. Wang, W. Wang, P.A. Coleman, D.A. Case, *J. Mol. Graphics Modell.* 25 (2006) 247–260.
- [44] T.J. Ewing, S. Makino, A.G. Skillman, I.D. Kuntz, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 15 (2001) 411–428.
- [45] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* 25 (13) (2004) 1605–1612.

- [46] E. Capieaux, C. Rapin, D. Thines, Y. Dupont, A. Goffeau, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 21895–21900.
- [47] V. Rai, S. Shukla, S. Jha, S.S. Komath, R. Prasat, *Biochemistry* 44 (2005) 6650–6661.
- [48] C. Mitchinson, A.F. Wilderspin, B.J. Trinnaman, N.M. Green, *FEBS Lett.* 146 (1) (1982) 87–92.
- [49] R.A. Farley, C.M. Tran, C.T. Carilli, D. Hawke, J.E. Shively, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 9532–9535.
- [50] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993).
- [51] T. Hiratsuka, K. Uchida, *Biochim. Biophys. Acta* 320 (1973) 635–647.
- [52] M. Kubala, *PROTEINS: Struct. Funct. and Bioinf.* 64 (2006) 1–12.
- [53] H. Linnertz, E. Lanz, M. Gregor, R. Antolovic, R. Krumscheid, T. Obsil, J. Slavik, Z. Kovarik, W. Schoner, E. Amler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254 (1) (1999) 215–221.
- [54] C. Mitchinson, A.F. Wilderspin, B.J. Trinnaman, N.M. Green, *FEBS Lett.* 146 (1982) 87–91.
- [55] M.I. De Michelis, A. Carnelli, F. Rasi-Caldogno, *Bot. Acta* 106 (1993) 20–25.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin

Lenka Grycova^a, Zdenek Lansky^a, Eliska Friedlova^a, Veronika Obsilova^a, Hana Janouskova^a, Tomas Obsil^{a,b}, Jan Teisinger^{a,*}

^a Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

^b Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, 128 43 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2008

Available online 26 August 2008

Keywords:

Vanilloid receptor

TRPV1

Calmodulin

Fluorescence anisotropy

ABSTRACT

Calmodulin (CaM) is known to play an important role in the regulation of TRP channels activity. Although it has been reported that CaM binds to the C-terminus of TRPV1 (TRPV1-CT), no classic CaM-binding motif was found in this region. In this work, we explored this unusual TRPV1 CaM-binding motif in detail and found that five residues from a putative CaM-binding motif are important for TRPV1-CT's binding to CaM, with arginine R785 being the most essential residue. The homology modelling suggests that a CaM-binding motif of TRPV1-CT forms an alpha helix that docks into the central cavity of CaM.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is a transmembrane ion channel that participates in physical and chemical pain-evoked signal transduction [1]. TRPV1 consists of six transmembrane domains, has two intracellular termini, and is proposed to form a tetrameric structure with a central localised pore [2]. This nonselective cation channel allows monovalent and some divalent cations (Ca²⁺, Mg²⁺) to move into the cell. As reported previously, calcium takes part in the process of desensitizing TRPV1 receptors and especially in its fast component [1]. Calmodulin (CaM), a ubiquitous calcium-binding protein, has been reported to be involved in Ca²⁺-dependent regulation of almost all members of the TRP channels family, including TRPV1 [3,4]. Many TRP channels possess multiple CaM-binding domains (CaM-BDs) located at both termini and which could show varying behaviours towards calcium [4]. The CaM-BD located on the N-terminus has been previously reported as an ankyrin repeat domain [3]. Despite the fact that CaM-BDs have no sequence homology, they share key structural features such as interspersed basic and bulky hydrophobic amino acid residues [5]. The C-terminal region of TRPV1 (TRPV1-CT) does not possess any classical previously defined CaM-binding motif. However, Numazaki et al. [6] reported that the region consisting of 35 amino acids (residues 767–801) at the C-terminus of TRPV1 shows the ability to bind to CaM in a Ca²⁺-dependent manner. This unusual CaM-binding motif matches the so-called 1-8-14 conserved motif at the positions 1 and 14 (according to Calmodulin Target Database <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>). In order to explore this unusual CaM-binding motif

of TRPV1-CT, we decided to study the roles of all its hydrophobic and basic residues. We have generated nine point mutants of rat TRPV1-CT (V769A, R771A, L777A, R778A, R781A, V782A, R785A, K788A, and R797A) and evaluated their effects on TRPV1-CT interaction with CaM. We have found that among the basic residues the arginine R785 is the most essential residue for TRPV1-CT binding to CaM. In addition, the analysis of hydrophobic valines located at the first and the last position of a tentative “1-8-14” conserved motif revealed that the residue at the first position plays a more important role in TRPV1-CT's binding to CaM.

Materials and methods

DNA cloning and introduction of site-directed mutations. DNA encoding rat TRPV1-CT (residues V686–K837) was ligated into pET32b (Novagen) using the EcoR I and Hind III sites. Mutants of TRPV1-CT (V769A, R771A, L777A, R778A, R781A, V782A, R785A, K788A, and R797A) were generated using the QuikChange approach (Stratagene). The result of the mutagenesis and integrity of the coding region were verified by sequencing.

Protein expression and purification protocol. TRPV1-CT was expressed as a fusion protein with thioredoxin in Rosetta *Escherichia coli* cells. The protein expression was induced by isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (Roth) for 12 h at 20 °C and purified using Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) according to the standard protocol. The next purification step was gel permeation chromatography on a Superdex 75 column (Amersham Pharmacia Biotech). The last purification step was affinity chromatography on Calmodulin Sepharose 4B (Amersham Biosciences), which step was used only for proteins with sufficient CaM-binding affinity. Protein samples were concentrated using

* Corresponding author. Fax: +420 2 4106 2488.

E-mail address: teisingr@biomed.cas.cz (J. Teisinger).

Millipore columns. Protein concentration was assessed by the measurement of absorption at 280 nm. The purity was checked using 12% SDS-PAGE.

Fluorescent steady-state anisotropy measurement. All steady-state experiments were measured using a ISS PC1™ Photon Counting Spectrofluorimeter. Calmodulin from bovine brain Alexa Fluor 488 conjugate was obtained from Molecular Probes (Oregon USA). Excitation and emission wavelengths were set to 494 and 520 nm, respectively. The amount of 600 pmol of labelled CaM was placed into a 1 ml quartz cuvette and 2 mM CaCl₂ or 5 mM EGTA was added to the binding buffer. Increasing amounts of the stock solution of TRPV1-CT fusion protein with thioredoxin were titrated, and the steady-state fluorescence anisotropy was recorded. No thioredoxin–CaM interference was observed in our experiments (data not shown).

The fraction of the CaM bound to the TRPV1-CT fusion protein (f_B) was calculated using:

$$f_B = \frac{r - r_F}{(r - r_F) + Q(r_B - r)}, \quad (1)$$

where r is observed anisotropy, r_F is anisotropy of free CaM, and r_B is anisotropy of CaM bound to the TRPV1-CT at saturation. The factor Q shows the ratio of fluorescence intensities of the bound and free forms [7].

Determination of dissociation constants. Binding affinity between CaM and TRPV1-CT fusion protein was calculated by fitting the dependence of the bound fraction of CaM (f_B) on the concentration of TRPV1-CT fusion protein to the equation [8]:

$$f_B = \frac{K_D + [P_1] + [P_2] - \sqrt{(K_D + [P_1] + [P_2])^2 - 4[P_1][P_2]}}{2[P_1]}, \quad (2)$$

where $[P_1]$ is CaM-Alexa Fluor 488 conjugate concentration, $[P_2]$ is TRPV1-CT fusion protein concentration, and K_D is a dissociation constant. All values are presented as means \pm SEM from at least three independent measurements.

Circular dichroism spectroscopy. Circular dichroism (CD) measurements were made using a JASCO J-810 spectropolarimeter. The far-UV CD spectra were measured from 200 to 260 nm at a scan rate of 100 nm/min in a quartz optical cell with a path length of 0.1 cm. All spectra were recorded in 0.5 nm wavelength increments with a 1.0 nm bandwidth and were corrected for background by subtracting appropriate buffer blanks. The final spectra were averages of 10 scans recorded at room temperature (23 °C). The protein concentration was 6 μ M in a 20 mM Tris–HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5, buffer. Three different samples were measured: TRPV1-CT fusion protein free and in the complex with CaM (molar ratio 1:1) and free CaM. Deconvolution of CD spectra was performed using the K2d programme available online at DICHROWEB [9].

Computer homology modelling. The sequence of the CaM-binding region of TRPV1-CT was modelled as an alpha helix using the CaM-binding peptide of myosin light chain kinase (MLCK) possessing a 1-8-14 motif as a template (pdb code 2BBM) [10]. The sequences of the TRPV1-CT (from V769 to R797) and template MLCK were aligned using the CLUSTALX 1.81 [11]. The model was built using the Modeller 8v3 [12]. The complex of TRPV1-CT's CaM-binding region bound to Ca²⁺-calmodulin [10] was created and energy minimised using a Swiss-PdbViewer with the GROMOS96 force field [13]. The final model was completed and validated by Coot [14].

Results

Preparation of soluble TRPV1-CT

In our previous work, the TRPV1-CT (sequence V686–K837) was expressed as fusion protein with glutathione *S*-transferase [15]. In

order to improve the expression yield and solubility we have decided to express and purify the TRPV1-CT (WT) and all its mutants as fusion proteins with thioredoxin at the N-terminus and a 6 \times His tag located at both termini. All expressed proteins were soluble, and expression yields were sufficient to perform spectroscopic studies. We were unable to remove the thioredoxin, as the TRPV1-CT alone has a strong tendency to aggregate. The analysis of circular dichroism spectra of thioredoxin–TRPV1-CT fusion protein (WT) (Fig. 1) revealed a secondary structure composition consistent with the theoretical prediction based on primary structure (26% β -sheet, 37% α -helix, and 28% random coils), suggesting that TRPV1-CT adopts a native fold.

TRPV1-CT binding to calmodulin

The main goal of this work was to characterise the unusual CaM-binding motif present at the C-terminus of TRPV1. To do so, we mutated all basic and some hydrophobic residues within this motif and evaluated their effects on TRPV1-CT binding to CaM using steady-state fluorescence anisotropy binding assay. Increasing amounts of TRPV1-CT were titrated into a cuvette containing fluorescently labelled CaM. Competition experiments confirmed that labelling CaM with the Alexa fluorescence dye had no effect on binding affinity within the experimental error (data not shown). The dissociation constant K_D for TRPV1-CT WT binding to CaM was estimated to be of $1.5 \pm 0.4 \mu$ M. The TRPV1-CT binds to CaM only in a calcium-dependent manner, as no interaction was observed in the absence of calcium. This is in agreement with results previously published by Numazaki et al. [6].

In following experiments, we studied the effect of nine point mutations of TRPV1-CT on its binding to CaM. We found that mutations L777A, R778A, R781A, and V782A had no effect on the TRPV1-CT's binding to CaM within the range of experimental error (Table 1). On the other hand, the mutants V769A, R771A, R785A, K788A, and R797A show significantly increased dissociation constants, suggesting that these residues are involved in TRPV1-CT's binding

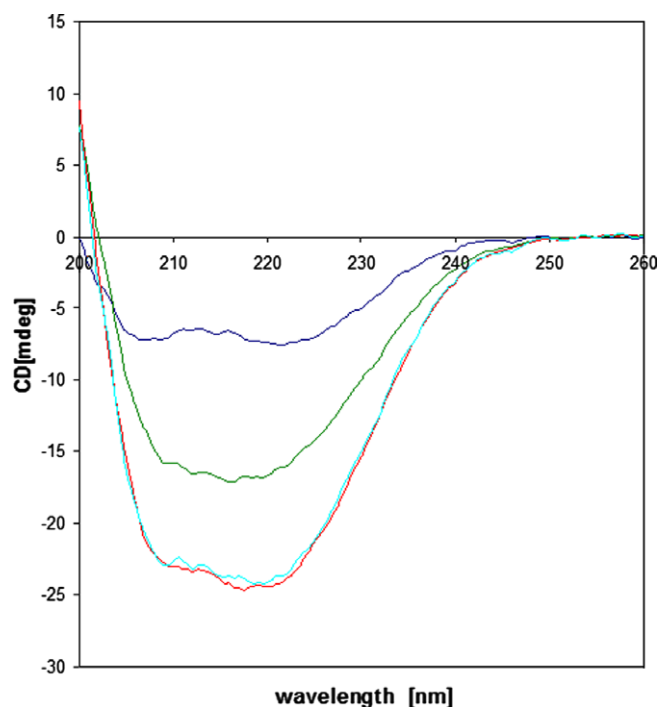


Fig. 1. CD spectra of purified recombinant thioredoxin–TRPV1-CT (in dark blue), CaM (in green), and mixture of thioredoxin–TRPV1-CT and CaM (in red).

Table 1
Apparent disassociation constants for TRPV1-CT binding to Alexa-CaM

Construct	Dissociation constants (μM)
WT	1.5 ± 0.4
R781	0.8 ± 0.2
R778	1.5 ± 0.3
L777	2.3 ± 0.5
K788	3.0 ± 0.5
R785	29.5 ± 5.8
R771	10.3 ± 1.6
R797	9.0 ± 1.7
V782	1.5 ± 0.2
V769	3.9 ± 0.9

to CaM (Table 1). The greatest decrease in binding affinity was observed for the R785A mutation, suggesting that this residue is the most important for TRPV1-CT's binding to CaM (see Fig. 2).

In order to check effects of potential changes in secondary structure of the thioredoxin-TRPV1-CT fusion protein upon the binding to CaM, we compared the CD spectrum of a mixture of TRPV1-CT and CaM (molar ratio 1:1) with the CD spectra of these proteins alone. Since the CD spectrum of the mixture is the sum of the CD spectra for thioredoxin-TRPV1-CT and CaM individually, this suggests that changes in the secondary structure of TRPV1-CT have no significant influence upon the binding to CaM (Fig. 1).

Homology modelling

In order to provide a structural explanation for the changes observed in TRPV1-CT binding to CaM, we have created a homology model of the CaM-binding motif of TRPV1-CT bound to Ca^{2+} -calmodulin (Fig. 3). This model was created using the template containing the 1-8-14 conserved CaM-binding motif with the greatest sequence similarity to the CaM-binding motif in TRPV1-CT. This model suggests that the CaM-binding motif of TRPV1-CT adopts an α -helical topology, as observed for the majority of such sequences [16]. Among the residues suggested to be important for TRPV1-CT's binding to CaM, based on our fluorescence measurements, the basic residues R771, R785, and K788 of TRPV1-CT are predicted to interact with negatively charged glutamate residues of CaM (E127, E84, and E47, respectively) (Fig. 4). The hydrophobic residue V769, whose mutation also significantly affects the binding, is predicted to interact with the side chain of F92. Our model

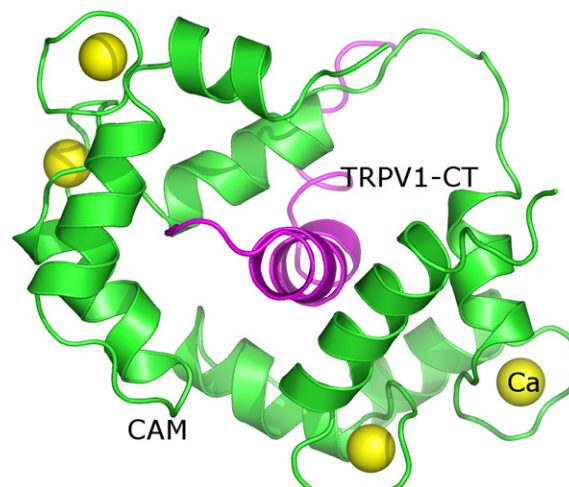


Fig. 3. Homology model of calmodulin binding region of TRPV1-CT (in magenta) bound to CaM. Calcium ions are depicted in yellow and CaM in green.

also predicts no specific polar interactions for residues R778 and R781, whose mutations have no effect on TRPV1-CT's binding to CaM. Thus, it seems that the CaM-binding motif of TRPV1-CT binds to CaM in a similar way as has been observed previously, for example for the CaM-binding peptide of MLCK used in our study as a template for homology modelling. Our data suggest, however, that in the case of TRPV1-CT's binding to CaM the polar interactions play a more important role than do the hydrophobic interactions.

Discussion

It has been established that CaM plays an important regulatory role in TRP channels activity [4]. Upon calcium-binding, the CaM undergoes large conformational changes [17]. Due to its great conformational flexibility, CaM has been found capable of binding to many physiologically important proteins, including ion channels containing CaM-BDs (e.g., members of the TRP ion channel family) [4]. Several classes of conserved motifs have been described: IQ, 1-5-10, 1-8-14, and 1-16 (according to the Calmodulin Target Database). Although it has been reported that CaM binds to a 35-aa segment in the TRPV1-CT, no classic CaM-binding motif was found to be involved in this interaction [6]. The main aim of this work was to explore this unusual CaM-binding motif in detail and find which amino acid residues are directly involved in binding to CaM. Therefore, we mutated nine residues within the CaM-binding motif of TRPV1-CT. The biggest decrease in binding affinity was observed for the R785A mutation, suggesting that this residue is the most important for TRPV1-CT's binding to CaM.

TRPV1-CT binding to CaM was studied using steady-state fluorescence anisotropy-based assay with Alexa-labeled CaM. From nine tested mutants of TRPV1-CT, five proteins showed significantly reduced binding to CaM (Table 1). Among these five binding-deficient mutants, four mutations involved positively charged residues and one a hydrophobic residue. The rest of the tested mutants showed no change in binding to CaM. Comparison of TRPV1-CT CaM-binding motif with CaM-binding motifs of known three-dimensional structure revealed similarity to the CaM-binding peptide of MLCK possessing a classical 1-8-14 motif [10]. These two motifs are similar but not identical, as there is a mismatch on position 8, where a hydrophobic amino acid in the CaM-binding peptide of MLCK is substituted with a polar serine (S776) in TRPV1. Employing this similarity, we built a homology model of the TRPV1-CT CaM-binding motif bound to Ca^{2+} -calmodulin (Figs. 3 and 4). This model revealed interactions that are in good agree-

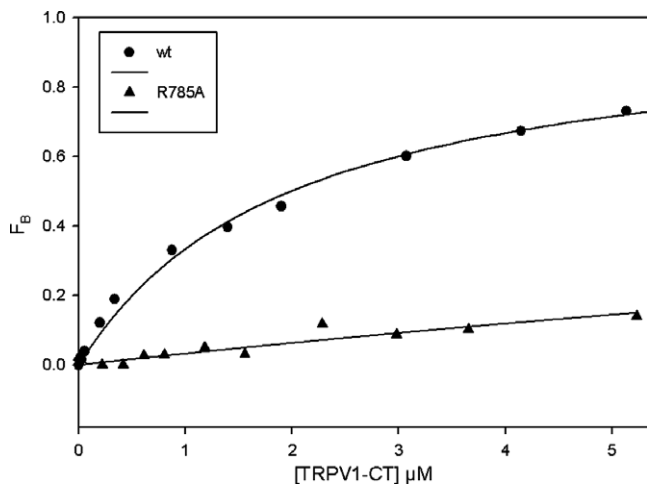


Fig. 2. Fluorescence anisotropy binding assay showing the effect of R785A mutation on TRPV1-CT binding to Alexa-CaM. TRPV1-CT WT (circles), TRPV1-CT R785A (triangles).

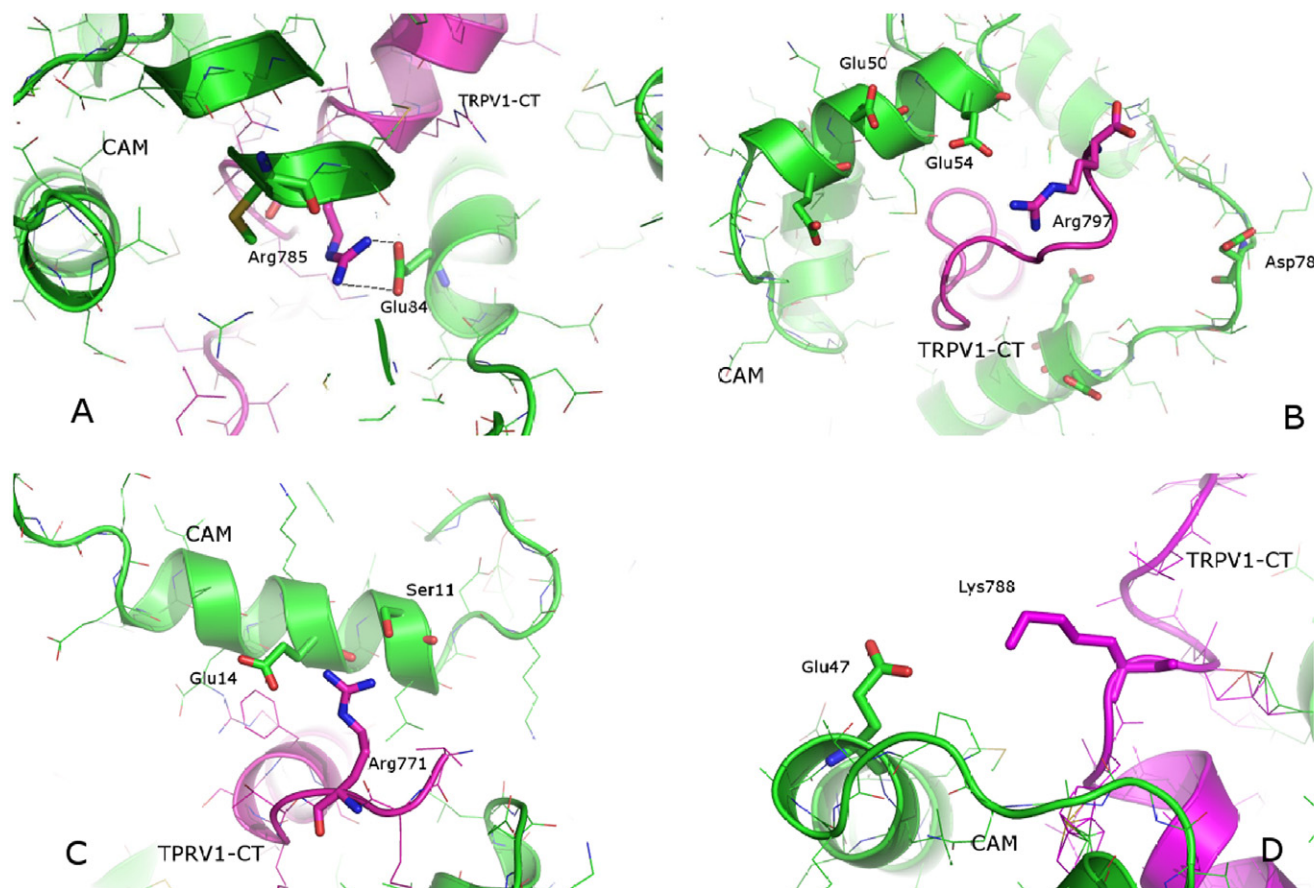


Fig. 4. Possible key interactions between TRPV1-CT and CaM. (A) between R785 of TRPV1-CT and E84 of CaM; (B) between R797 of TRPV1-CT and E47, D50, E54, or E83 of CaM; (C) between R771 of TRPV1-CT and E14 of CaM; and (D) between K788 of TRPV1-CT and E47 of CaM.

ment with our mutagenesis experiments. Four of five residues suggested to be essential for TRPV1-CT's binding to CaM are predicted to be involved in interactions with calmodulin (through either ionic or hydrophobic interactions) while non-essential residues show no specific contacts. Thus, we may speculate that the CaM-binding motif of TRPV1-CT binds to calmodulin in a similar way as has been observed previously (for example for the CaM-binding peptide of MLCK), as a basic amphiphilic α -helix docked into the central cavity of CaM. It seems, however, that in the case of TRPV1-CT the polar interactions play more important roles than do the hydrophobic interactions.

Acknowledgments

We thank Dr. R.W. Gereau of Baylor College of Medicine, Houston, TX for providing us with rat TRPV1-CT cDNA. This work was supported by Grant IAA600110701 of the GAAV, by grants 303/07/0915 and GACRGA CR 305/08/H037, of the GACR, by Research Project MSM0021620857 and the Centre of Neurosciences LC554 of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, and by Research Project No. AVOZ 50110509 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

References

- [1] M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389 (1997) 816–824.
- [2] G. Owsianik, D. D'Hoedt, T. Voets, B. Nilius, Structure–function relationship of the TRP channel superfamily, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 156 (2006) 61–90.
- [3] T. Rosenbaum, A. Gordon-Shaag, M. Munari, S.E. Gordon, Ca^{2+} /calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin, *J. Gen. Physiol.* 123 (2004) 53–62.
- [4] M.X. Zhu, Multiple roles of calmodulin and other Ca^{2+} -binding proteins in the functional regulation of TRP channels, *Pflügers Arch.* 451 (2005) 105–115.
- [5] S.W. Vetter, E. Leclerc, Novel aspects of calmodulin target recognition and activation, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 404–414.
- [6] M. Numazaki, T. Tominaga, K. Takeuchi, N. Murayama, H. Toyooka, M. Tominaga, Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 8002–8006.
- [7] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third ed., Springer, New York, 2006.
- [8] E. Boura, J. Silhan, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, J. Teisinger, V. Obsilova, T. Obsil, Both the N-terminal loop and wing W2 of the forkhead domain of transcription factor Foxo4 are important for DNA binding, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 8265–8275.
- [9] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W668–W673.
- [10] M. Ikura, G. Barbato, C.B. Klee, A. Bax, Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment, *Cell Calcium* 13 (1992) 391–400.
- [11] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [12] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779–815.
- [13] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723.
- [14] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2126–2132.
- [15] L. Grycova, Z. Lansky, E. Friedlova, V. Vlachova, M. Kubala, V. Obsilova, T. Obsil, J. Teisinger, ATP binding site on the C-terminus of the vanilloid receptor, *Arch. Biochem. Biophys.* 465 (2007) 389–398.
- [16] A.R. Rhoads, F. Friedberg, Sequence motifs for calmodulin recognition, *FASEB J.* 11 (1997) 331–340.
- [17] J.L. Fallon, F.A. Quirocho, A closed compact structure of native Ca^{2+} -calmodulin, *Structure* 11 (2003) 1303–1307.

7. Seznam použité literatury

- Ahern, G. P. (2003). "Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide." J Biol Chem **278**(33): 30429-34.
- Ambudkar, S. V., I. W. Kim, et al. (2006). "The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding." FEBS Lett **580**(4): 1049-55.
- Babu, Y. S., C. E. Bugg, et al. (1988). "Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution." J Mol Biol **204**(1): 191-204.
- Babu, Y. S., J. S. Sack, et al. (1985). "Three-dimensional structure of calmodulin." Nature **315**(6014): 37-40.
- Barbato, G., M. Ikura, et al. (1992). "Backbone dynamics of calmodulin studied by ¹⁵N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible." Biochemistry **31**(23): 5269-78.
- Baumann, T. K. and M. E. Martenson (2000). "Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels." J Neurosci **20**(11): RC80.
- Benham, C. D., J. B. Davis, et al. (2002). "Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels." Neuropharmacology **42**(7): 873-88.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Bhave, G., H. J. Hu, et al. (2003). "Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12480-5.
- Bhave, G., W. Zhu, et al. (2002). "cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation." Neuron **35**(4): 721-31.
- Brauchi, S., G. Orta, et al. (2007). "Dissection of the components for PIP₂ activation and thermosensation in TRP channels." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10246-51.

- Capieaux, E., C. Rapin, et al. (1993). "Overexpression in Escherichia coli and purification of an ATP-binding peptide from the yeast plasma membrane H(+)-ATPase." J Biol Chem **268**(29): 21895-900.
- Caterina, M. J. and D. Julius (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." Annu Rev Neurosci **24**: 487-517.
- Caterina, M. J., A. Leffler, et al. (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288**(5464): 306-13.
- Caterina, M. J., T. A. Rosen, et al. (1999). "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat." Nature **398**(6726): 436-41.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-24.
- Clapham, D. E., L. W. Runnels, et al. (2001). "The TRP ion channel family." Nat Rev Neurosci **2**(6): 387-96.
- Colbert, H. A., T. L. Smith, et al. (1997). "OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in Caenorhabditis elegans." J Neurosci **17**(21): 8259-69.
- Dai, Y., T. Moriyama, et al. (2004). "Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain." J Neurosci **24**(18): 4293-9.
- Davis, J. B., J. Gray, et al. (2000). "Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia." Nature **405**(6783): 183-7.
- De Petrocellis, L., S. Harrison, et al. (2001). "The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase." J Neurochem **77**(6): 1660-3.
- Dean, M., A. Rzhetsky, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-66.
- Denis, V. and M. S. Cyert (2002). "Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue." J Cell Biol **156**(1): 29-34.
- Diederichs, K., J. Diez, et al. (2000). "Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon Thermococcus litoralis." Embo J **19**(22): 5951-61.

- Docherty, R. J., J. C. Yeats, et al. (1996). "Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats." *Pflugers Arch* **431**(6): 828-37.
- Driscoll, W. J., K. Komatsu, et al. (1995). "Proposed active site domain in estrogen sulfotransferase as determined by mutational analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12328-32.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- Ewing, T. J., S. Makino, et al. (2001). "DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases." *J Comput Aided Mol Des* **15**(5): 411-28.
- Fallon, J. L. and F. A. Quioco (2003). "A closed compact structure of native Ca(2+)-calmodulin." *Structure* **11**(10): 1303-7.
- Farley, R. A., C. M. Tran, et al. (1984). "The amino acid sequence of a fluorescein-labeled peptide from the active site of (Na,K)-ATPase." *J Biol Chem* **259**(15): 9532-5.
- Fernandez-Ballester, G. and A. Ferrer-Montiel (2008). "Molecular Modeling of the Full-length Human TRPV1 Channel in Closed and Desensitized States." *J Membr Biol*.
- Garcia-Martinez, C., C. Morenilla-Palao, et al. (2000). "Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties." *J Biol Chem* **275**(42): 32552-8.
- Garcia-Sanz, N., A. Fernandez-Carvajal, et al. (2004). "Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor." *J Neurosci* **24**(23): 5307-14.
- Gaudet, R. and D. C. Wiley (2001). "Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing." *Embo J* **20**(17): 4964-72.
- Gavva, N. R., A. W. Bannon, et al. (2007). "The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation." *J Neurosci* **27**(13): 3366-74.
- Gavva, N. R., L. Klionsky, et al. (2004). "Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1." *J Biol Chem* **279**(19): 20283-95.

- Geiser, J. R., D. van Tuinen, et al. (1991). "Can calmodulin function without binding calcium?" Cell **65**(6): 949-59.
- Gerstein, M. and W. Krebs (1998). "A database of macromolecular motions." Nucleic Acids Res **26**(18): 4280-90.
- Gilbert, D., K. Funk, et al. (2007). "Caged capsaicins: New tools for the examination of TRPV1 channels in somatosensory neurons." Chembiochem **8**(1): 89-97.
- Gryčová, L., Z. Lánský, et al. (2008). "Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin." Biochem Biophys Res Commun.
- Gryčová, L., Z. Lánský, et al. (2007). "ATP binding site on the C-terminus of the vanilloid receptor." Arch Biochem Biophys **465**(2): 389-98.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-23.
- Gunthorpe, M. J., C. D. Benham, et al. (2002). "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels." Trends Pharmacol Sci **23**(4): 183-91.
- Gunthorpe, M. J. and A. Szallasi (2008). "Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms." Curr Pharm Des **14**(1): 32-41.
- Hellwig, N., N. Albrecht, et al. (2005). "Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits." J Cell Sci **118**(Pt 5): 917-28.
- Hellwig, N., T. D. Plant, et al. (2004). "TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons." J Biol Chem **279**(33): 34553-61.
- Higgins, M. K., D. Weitz, et al. (2002). "Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains." Embo J **21**(9): 2087-94.
- Hiratsuka, T. (2003). "Fluorescent and colored trinitrophenylated analogs of ATP and GTP." Eur J Biochem **270**(17): 3479-85.
- Hiratsuka, T., I. Sakata, et al. (1973). "Synthesis and properties of N6-(2, 4-dinitrophenyl)-adenosine 5'-triphosphate, an analog of ATP." J Biochem **74**(4): 649-59.
- Hiratsuka, T. and K. Uchida (1973). "Preparation and properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate, an analog of adenosine triphosphate." Biochim Biophys Acta **320**(3): 635-47.

- Hoenderop, J. G., T. Voets, et al. (2003). "Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6." Embo J **22**(4): 776-85.
- Hu, H. J., G. Bhave, et al. (2002). "Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia." J Neurosci **22**(17): 7444-52.
- Huang, S. M., T. Bisogno, et al. (2002). "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8400-5.
- Hung, L. W., I. X. Wang, et al. (1998). "Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter." Nature **396**(6712): 703-7.
- Hwang, S. W., H. Cho, et al. (2000). "Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6155-60.
- Cheney, R. E. and M. S. Mooseker (1992). "Unconventional myosins." Curr Opin Cell Biol **4**(1): 27-35.
- Chiu, P. L., M. D. Pagel, et al. (2007). "The structure of the prokaryotic cyclic nucleotide-modulated potassium channel MloK1 at 16 Å resolution." Structure **15**(9): 1053-64.
- Chou, M. Z., T. Mtui, et al. (2004). "Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain." Biochemistry **43**(9): 2501-11.
- Ikura, M. (1996). "Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins." Trends Biochem Sci **21**(1): 14-7.
- Ikura, M., G. Barbato, et al. (1992). "Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment." Cell Calcium **13**(6-7): 391-400.
- Ikura, M., G. M. Clore, et al. (1992). "Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR." Science **256**(5057): 632-8.
- Jha, S., N. Karnani, et al. (2003). "Purification and characterization of the N-terminal nucleotide binding domain of an ABC drug transporter of *Candida albicans*: uncommon cysteine 193 of Walker A is critical for ATP hydrolysis." Biochemistry **42**(36): 10822-32.
- Jin, X., N. Morsy, et al. (2004). "Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase." Am J Physiol Cell Physiol **287**(2): C558-63.

- Jin, X., J. Touhey, et al. (2006). "Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel." J Biol Chem **281**(35): 25006-10.
- Jordt, S. E. and D. Julius (2002). "Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers." Cell **108**(3): 421-30.
- Jordt, S. E., D. D. McKemy, et al. (2003). "Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation." Curr Opin Neurobiol **13**(4): 487-92.
- Jordt, S. E., M. Tominaga, et al. (2000). "Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8134-9.
- Jung, J., S. W. Hwang, et al. (1999). "Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel." J Neurosci **19**(2): 529-38.
- Jung, J., S. Y. Lee, et al. (2002). "Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1." J Biol Chem **277**(46): 44448-54.
- Jung, J., J. S. Shin, et al. (2004). "Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding." J Biol Chem **279**(8): 7048-54.
- Kaupp, U. B. and R. Seifert (2002). "Cyclic nucleotide-gated ion channels." Physiol Rev **82**(3): 769-824.
- Kedei, N., T. Szabo, et al. (2001). "Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1." J Biol Chem **276**(30): 28613-9.
- Kim, J., Y. D. Chung, et al. (2003). "A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*." Nature **424**(6944): 81-4.
- Koplas, P. A., R. L. Rosenberg, et al. (1997). "The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons." J Neurosci **17**(10): 3525-37.
- Kretsinger, R. H. and C. E. Nockolds (1973). "Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description." J Biol Chem **248**(9): 3313-26.
- Kubala, M., K. Hofbauerová, et al. (2002). "Phe(475) and Glu(446) but not Ser(445) participate in ATP-binding to the alpha-subunit of Na(+)/K(+)-ATPase." Biochem Biophys Res Commun **297**(1): 154-9.
- Kubala, M., J. Plášek, et al. (2003). "Limitations in linearized analyses of binding equilibria: binding of TNP-ATP to the H4-H5 loop of Na/K-ATPase." Eur Biophys J **32**(4): 363-9.

- Kubala, M., J. Plášek, et al. (2004). "Fluorescence competition assay for the assessment of ATP binding to an isolated domain of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase." Physiol Res **53**(1): 109-13.
- Kwak, J., M. H. Wang, et al. (2000). "Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains." J Neurosci **20**(22): 8298-304.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Springer.
- Lánský, Z., M. Kubala, et al. (2004). "The hydrogen bonds between Arg423 and Glu472 and other key residues, Asp443, Ser477, and Pro489, are responsible for the formation and a different positioning of TNP-ATP and ATP within the nucleotide-binding site of Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase." Biochemistry **43**(26): 8303-11.
- Laskowski, R. A., D. S. Moss, et al. (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." J Mol Biol **231**(4): 1049-67.
- Lewis, H. A., X. Zhao, et al. (2005). "Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure." J Biol Chem **280**(2): 1346-53.
- Lima, C. D., K. L. D'Amico, et al. (1997). "MAD analysis of FHIT, a putative human tumor suppressor from the HIT protein family." Structure **5**(6): 763-74.
- Linnertz, H., E. Lanz, et al. (1999). "Microenvironment of the high affinity ATP-binding site of Na⁺/K⁺-ATPase is slightly acidic." Biochem Biophys Res Commun **254**(1): 215-21.
- Lishko, P. V., E. Procko, et al. (2007). "The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity." Neuron **54**(6): 905-18.
- Liu, L. and S. A. Simon (1996). "Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells." J Neurophysiol **75**(4): 1503-14.
- Liu, L., W. Zhu, et al. (2004). "Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors." J Neurophysiol **91**(4): 1482-91.
- Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel." Science **309**(5736): 897-903.
- Long, S. B., X. Tao, et al. (2007). "Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment." Nature **450**(7168): 376-82.

- Lyfenko, A., V. Vlachová, et al. (2002). "The effects of excessive heat on heat-activated membrane currents in cultured dorsal root ganglia neurons from neonatal rat." Pain **95**(3): 207-14.
- Macpherson, L. J., B. H. Geierstanger, et al. (2005). "The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin." Curr Biol **15**(10): 929-34.
- Mandadi, S., M. Numazaki, et al. (2004). "Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels." Cell Calcium **35**(5): 471-8.
- McCleverty, C. J., E. Koesema, et al. (2006). "Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain." Protein Sci **15**(9): 2201-6.
- McNamara, F. N., A. Randall, et al. (2005). "Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1)." Br J Pharmacol **144**(6): 781-90.
- Meador, W. E., A. R. Means, et al. (1993). "Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures." Science **262**(5140): 1718-21.
- Mitchinson, C., A. F. Wilderspin, et al. (1982). "Identification of a labelled peptide after stoichiometric reaction of fluorescein isothiocyanate with the Ca²⁺ - dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum." FEBS Lett **146**(1): 87-92.
- Mohapatra, D. P., S. Y. Wang, et al. (2003). "A tyrosine residue in TM6 of the Vanilloid Receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents." Mol Cell Neurosci **23**(2): 314-24.
- Moiseenkova-Bell, V. Y., L. A. Stanciu, et al. (2008). "Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(21): 7451-5.
- Molday, R. S. (1996). "Calmodulin regulation of cyclic-nucleotide-gated channels." Curr Opin Neurobiol **6**(4): 445-52.
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-23.
- Moriyama, T., T. Higashi, et al. (2005). "Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins." Mol Pain **1**: 3.

- Moriyama, T., T. Iida, et al. (2003). "Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity." J Neurosci **23**(14): 6058-62.
- Mosavi, L. K., T. J. Cammett, et al. (2004). "The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition." Protein Sci **13**(6): 1435-48.
- Nakayama, S. and R. H. Kretsinger (1994). "Evolution of the EF-hand family of proteins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **23**: 473-507.
- Nilius, B., J. Vriens, et al. (2004). "TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity." Am J Physiol Cell Physiol **286**(2): C195-205.
- Nilius, B., H. Watanabe, et al. (2003). "The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour." Pflugers Arch **446**(3): 298-303.
- Numazaki, M., T. Tominaga, et al. (2003). "Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 8002-6.
- Numazaki, M., T. Tominaga, et al. (2002). "Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues." J Biol Chem **277**(16): 13375-8.
- O'Neil, K. T. and W. F. DeGrado (1990). "How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices." Trends Biochem Sci **15**(2): 59-64.
- Ostermann, N., A. Lavie, et al. (2000). "Potentiating AZT activation: structures of wild-type and mutant human thymidylate kinase suggest reasons for the mutants' improved kinetics with the HIV prodrug metabolite AZTMP." J Mol Biol **304**(1): 43-53.
- Owsianik, G., D. D'Hoedt, et al. (2006). "Structure-function relationship of the TRP channel superfamily." Rev Physiol Biochem Pharmacol **156**: 61-90.
- Palmer, C. P., X. L. Zhou, et al. (2001). "A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7801-5.
- Patapoutian, A., A. M. Peier, et al. (2003). "ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation." Nat Rev Neurosci **4**(7): 529-39.
- Pedersen, S. F., G. Owsianik, et al. (2005). "TRP channels: an overview." Cell Calcium **38**(3-4): 233-52.

- Persechini, A. and R. H. Kretsinger (1988). "Toward a model of the calmodulin-myosin light-chain kinase complex: implications for calmodulin function." J Cardiovasc Pharmacol **12 Suppl 5**: S1-12.
- Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, et al. (1999). "Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels." Neuron **22**(3): 549-58.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-12.
- Phillips, E., A. Reeve, et al. (2004). "Identification of species-specific determinants of the action of the antagonist capsazepine and the agonist PPAHV on TRPV1." J Biol Chem **279**(17): 17165-72.
- Piper, A. S., J. C. Yeats, et al. (1999). "A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization." J Physiol **518 (Pt 3)**: 721-33.
- Premkumar, L. S., Z. H. Qi, et al. (2004). "Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor." J Neurophysiol **91**(3): 1442-9.
- Prescott, E. D. and D. Julius (2003). "A modular PIP₂ binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity." Science **300**(5623): 1284-8.
- Rai, V., S. Shukla, et al. (2005). "Functional characterization of N-terminal nucleotide binding domain (NBD-1) of a major ABC drug transporter Cdr1p of *Candida albicans*: uncommon but conserved Trp326 of Walker B is important for ATP binding." Biochemistry **44**(17): 6650-61.
- Ramsey, I. S., M. Delling, et al. (2006). "An introduction to TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 619-47.
- Rathee, P. K., C. Distler, et al. (2002). "PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia." J Neurosci **22**(11): 4740-5.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." Faseb J **11**(5): 331-40.
- Robinson, R. B. and S. A. Siegelbaum (2003). "Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function." Annu Rev Physiol **65**: 453-80.
- Rosenbaum, T., A. Gordon-Shaag, et al. (2004). "Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin." J Gen Physiol **123**(1): 53-62.

- Rutter, A. R., Q. P. Ma, et al. (2005). "Heteromerization and colocalization of TrpV1 and TrpV2 in mammalian cell lines and rat dorsal root ganglia." Neuroreport **16**(16): 1735-9.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.
- Sansom, M. S., I. H. Shrivastava, et al. (2002). "Potassium channels: structures, models, simulations." Biochim Biophys Acta **1565**(2): 294-307.
- Satishchandran, C., Y. N. Hickman, et al. (1992). "Characterization of the phosphorylated enzyme intermediate formed in the adenosine 5'-phosphosulfate kinase reaction." Biochemistry **31**(47): 11684-8.
- Sedgwick, S. G. and S. J. Smerdon (1999). "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework." Trends Biochem Sci **24**(8): 311-6.
- Smith, P. C., N. Karpowich, et al. (2002). "ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer." Mol Cell **10**(1): 139-49.
- Sokolova, O. (2004). "Structure of cation channels, revealed by single particle electron microscopy." FEBS Lett **564**(3): 251-6.
- Sokolova, O., A. Accardi, et al. (2003). "Conformational changes in the C terminus of Shaker K⁺ channel bound to the rat Kvbeta2-subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12607-12.
- Story, R. M., I. T. Weber, et al. (1992). "The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer." Nature **355**(6358): 318-25.
- Sugiura, T., M. Tominaga, et al. (2002). "Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1." J Neurophysiol **88**(1): 544-8.
- Szallasi, A. and P. M. Blumberg (1999). "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms." Pharmacol Rev **51**(2): 159-212.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.
- Tominaga, M. and M. J. Caterina (2004). "Thermosensation and pain." J Neurobiol **61**(1): 3-12.

- Tominaga, M., M. J. Caterina, et al. (1998). "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli." Neuron **21**(3): 531-43.
- Tominaga, M. and T. Tominaga (2005). "Structure and function of TRPV1." Pflugers Arch **451**(1): 143-50.
- Tominaga, M., M. Wada, et al. (2001). "Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6951-6.
- Trevisani, M., D. Smart, et al. (2002). "Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1." Nat Neurosci **5**(6): 546-51.
- Vennekens, R., G. Owsianik, et al. (2008). "Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview." Curr Pharm Des **14**(1): 18-31.
- Vetter, S. W. and E. Leclerc (2003). "Novel aspects of calmodulin target recognition and activation." Eur J Biochem **270**(3): 404-14.
- Vlachová, V., J. Teisinger, et al. (2003). "Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1." J Neurosci **23**(4): 1340-50.
- Voets, T., G. Droogmans, et al. (2004). "The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels." Nature **430**(7001): 748-54.
- Voets, T., K. Talavera, et al. (2005). "Sensing with TRP channels." Nat Chem Biol **1**(2): 85-92.
- Vyklický, L., H. Knotkova-Urbancová, et al. (1998). "Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats." J Neurophysiol **79**(2): 670-6.
- Vyklický, L., A. Lyfenko, et al. (2003). "Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly." Neuroreport **14**(7): 1061-5.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." Embo J **1**(8): 945-51.
- Wang, J., W. Wang, et al. (2006). "Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations." J Mol Graph Model **25**(2): 247-60.
- Welch, J. M., S. A. Simon, et al. (2000). "The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13889-94.

- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2004). "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W668-73.
- Wiese, C., J. M. Hinz, et al. (2006). "Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination." Nucleic Acids Res **34**(9): 2833-43.
- Xu, H., N. T. Blair, et al. (2005). "Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism." J Neurosci **25**(39): 8924-37.
- Yap, K. L., J. B. Ames, et al. (1999). "Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily." Proteins **37**(3): 499-507.
- Zagotta, W. N., N. B. Olivier, et al. (2003). "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." Nature **425**(6954): 200-5.
- Zhang, M., T. Tanaka, et al. (1995). "Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin." Nat Struct Biol **2**(9): 758-67.
- Zhang, N., S. Inan, et al. (2005). "A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4536-41.
- Zhu, M. X. (2005). "Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels." Pflugers Arch **451**(1): 105-15.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, et al. (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." Nature **399**(6732): 159-62.
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, et al. (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." Nature **400**(6743): 452-7.