

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky
2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Dizertační práce

**VANILOIDNÍ RECEPTOR TRPV1
V MECHANIZMECH AKUTNÍ BOLESTI**

Karolina Nováková (roz. Toušová)

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha 2009

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svůj dík všem, kteří mě během mého doktorského studia podporovali.

V první řadě nesmírně děkuji své školitelce RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc. za milý kolegiální přístup a vytvoření dobrých pracovních podmínek během mého studia na oddělení buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AVČR a za obětavost a trpělivost při odborném vedení této dizertační práce. Můj velký dík patří MUDr. Ladislavu Vyklickému st., DrSc. za cenné konzultace z oboru Neurověd a praktické rady při laboratorní práci. Také bych velice ráda poděkovala Ing. Janu Teisingerovi, CsC. za odborné připomínky především z oblasti molekulární biologie, Ing. Ivanu Dittertovi, CsC. za cennou technickou pomoc při experimentech a Magdě Kuntošové za veškerý laboratorní servis.

Velice děkuji svým rodičům, kteří při mně stáli a dodávali mi tolik potřebný elán a optimismus. Tuto dizertační práci bych také jen těžko psala bez velkého pochopení a lásky svého muže Jirky, který mi byl velkou oporou.

Obsah

1. ÚVOD	4
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	5
2.1 VANILOIDNÍ (KAPSAICINOVÝ) RECEPTOR - IONTOVÝ KANÁL AKTIVOVANÝ PODNĚTY, JEŽ VYVOLÁVAJÍ U ČLOVĚKA BOLEST.....	5
2.1.1 Distribuce TRPV1 receptoru	6
2.1.2 Význam studia funkce TRPV1 receptoru ve vztahu k jeho struktuře	7
2.2 TRP RECEPTORY	8
2.2.1 Vaniloidní TRPV1 receptor v kontextu s ostatními TRP kanály.....	8
2.2.2 Rozdělení TRP kanálů podle homologie primární struktury	9
2.2.3 Fyziologická úloha TRP iontových kanálů.....	12
2.2.4 Základní charakteristiky TRP kanálů.....	13
2.3 STRUKTURA TRPV1 RECEPTORU	22
2.4 SEŠŤŘIHOVÉ VARIANTY TRPV1 RECEPTORU	25
2.5.1 Chemické aktivátory	26
2.5.2 Fyzikální aktivátory.....	32
2.6 MECHANIZMY INHIBICE TRPV1 RECEPTORU	34
2.6.1 Kompetitivní inhibitory.....	35
2.6.2 Nekompetitivní inhibitory.....	38
2.7 MODULACE TRPV1 RECEPTORU	39
2.7.1 Mechanizmy senzitivace a fosforylace: PKC, PKA, CaMKII.....	39
2.7.2 Modulace membránovým lipidem PIP ₂	40
2.7.3 Možné mechanismy vzniku desenzitizace TRPV1 receptoru	41
3. CÍLE PRÁCE	43
4. MATERIÁL A METODY	44
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	46
5.1 MECHANIZMY AKUTNÍ DESENZITIZACE TRPV1 RECEPTORU	46
5.1.1 Vliv teploty na rychlost akutní desenzitizace závislé na vápníku	46
5.1.2 Akutní desenzitizace snižuje afinitu vazebního místa pro kapsaicin.....	47
5.1.3 Defosforylace S502 a T704 není příčinou akutní desenzitizace	49
5.1.4 Klíčová úloha argininu na pozici 701 v regulaci aktivity TRPV1	50
5.2 MECHANIZMY PŮSOBNÍ OXIDAČNÍCH A REDUKČNÍCH LÁTEK NA TRPV1 RECEPTOR.....	52
5.2.1 Působení redukčních látek.....	53
5.2.2 Působení oxidačních látek.....	55
5.2.3 Účinek alkylačního činidla N-ethylmaleimidu (NEM)	56
5.2.4 Oxidační látky snižují koncentraci aktivátorů iontových kanálů.....	57
5.2.5 Oxidační látka komplex kationů mědi s 1.10-fenantrolinem (CuPhe) působí jako blokátor TRPV1 kanálu	57
5.2.6 Význam oxidačně-redukčního stavu TRPV1 z hlediska přenosu bolesti	61
5.3 MODULACE TRPV1 RECEPTORU GADOLINIEM	62
6. ZÁVĚR	68
7. SEZNAM ČLÁNKŮ PUBLIKOVANÝCH V RÁMCI PHD STUDIA	71
8. LITERATURA	73
9. SEZNAM ZKRATEK	86

1. ÚVOD

Jedním z významných objevů, jež v posledním desetiletí ovlivnily nové směry výzkumu mechanismů nocicepce a bolesti, byla molekulární identifikace vaniloidního receptoru TRPV1. Tento membránový protein je převážně exprimován na periferních zakončeních některých nemyelinizovaných a slabě myelinizovaných primárních aferentních vláken, v jejichž plazmatických membránách vytváří neselektivní kationtové kanály, které lze specificky aktivovat kapsaicinem, zvýšením teploty překračující fyziologický práh 43 °C a slabými kyselinami. Aktivita TRPV1 receptoru, jehož fyziologická úloha byla prokázána především v souvislosti se vznikem tepelné hyperalgezie, se významně zvyšuje v přítomnosti mediátorů zánětu (bradykinin, serotonin, prostaglandin aj.). Přestože je molekulární struktura TRPV1 známa již od roku 1997, jsou v současné době zatím popsány jen některé mechanismy, které se uplatňují v procesech jeho aktivace a senzitivace. Tyto poznatky zatím vedly k vývoji sofistikovaných ligandů strukturálně příbuzných kapsaicinu, látky, která je již odnepaměti využívána k léčbě některých bolestivých stavů.

Úsilí, s jakým byly v uplynulém desetiletí analyzovány funkční vlastnosti TRPV1 receptoru a jejich souvislost s molekulární strukturou, nemá v dějinách biologických a lékařských věd obdoby (Nilius et al., 2007). Výzkum, jenž byl především motivován snahou nalézt nové účinnější látky pro léčbu bolesti, vedl k objevu dalších receptorů, které se podobně jako TRPV1 mohou uplatňovat v procesech spojených s přenosem bolestivých podnětů na primárních nociceptivních neuronech savců.

Při současném stavu poznání je však obtížné předvídat, kolik odlišných receptorově řízených iontových kanálů se podílí na nocicepci a na vzniku chronické bolesti. Je však zřejmé, že tyto receptory, jež jsou součástí plazmatických membrán primárních polymodálních nociceptorů, jsou aktivovány podněty různých modalit, které vyvolávají bolest u lidí. Vyřazení jejich funkčního genu u experimentálních zvířat vede ke sníženému vnímání tepelných a chemických podnětů.

Předložená dizertační práce se zabývá mechanismy, které se uplatňují při modulaci aktivity TRPV1 receptoru, shrnuje dílčí poznatky o vztahu struktury a funkce TRPV1 iontového kanálu, uvádí nové výsledky, týkající se desenzitivace TRPV1 závislé na vápníku a pokouší se uvést tyto poznatky do souvislosti se strukturálně-funkčními vlastnostmi jiných TRP receptorů homologních k TRPV1 receptoru.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Vaniloidní (kapsaicinový) receptor - iontový kanál aktivovaný podněty, jež vyvolávají u člověka bolest

Mechanismy zajišťující vnímání bolesti jsou spolu s dalšími orgány smyslového cití součástí sensorického systému, který informuje živočichy o aktuálním stavu zevního prostředí a umožňuje jim tak čelit případnému nebezpečí v jejich okolí. Na mnoha experimentálních modelech bylo prokázáno, že obranné reakce podobné těm, které jsou u člověka provázeny bolestí, vykazují všichni živočichové včetně bezobratlých, jako jsou např. hmyz nebo červi. Jde zřejmě o vývojově nejstarší obranný mechanismus, který hraje nezastupitelnou úlohu z hlediska zachování života a integrity vnitřního prostředí živočichů. Bolest může člověk vnímat různou měrou, ale vždy jde o nepříjemný pocit, který snižuje kvalitu života nebo je s ním dokonce neslučitelný. Odpradáva je proto vynakládáno velké úsilí porozumět nervovým mechanismům přenosu podnětů, které vyvolávají u člověka bolest, zejména z hlediska vyhledávání nových farmakologických přístupů, kterými by bylo možné léčit bolestivé stavy.

Mnoho cenných informací o mechanismech přenosu bolestivých podnětů bylo v průběhu druhé poloviny 20. století získáno na neuronech izolovaných z ganglií zadních kořenů míšních (DRG neuronů) a trigeminálních ganglií (pro přehled viz. (Szallasi et al., 1999)). Postupně se prokázalo, že citlivost ke kapsaicinu je zvláštní vlastností neuronů vykazujících nocicepční charakteristiku a také se dalo předpokládat, že pro tuto exogenní látku existují specifické receptory. Ukázalo se, že citlivost ke kapsaicinu a dalším pálivým vaniloidům souvisí s citlivostí neuronů k řadě dalších algogenních látek (Vyklícky et al., 1998) a k teplotám přesahujícím fyziologické hodnoty (Cesare and McNaughton, 1996).

Jedním z významných objevů, jež výrazně poznamenaly nejnovější směry výzkumu mechanismů nocicepce a bolesti, byla molekulární identifikace vaniloidního (kapsaicinového) receptoru (Caterina et al., 1997). Molekulárně genetickými metodami založenými na principu PCR (polymerázové řetězové reakce) se z rozsáhlé knihovny komplementární DNA (cDNA) izolované z neuronů ganglií zadních kořenů míšních podařilo identifikovat cDNA kódující kapsaicinový receptor na základě jeho

charakteristické vysoké propustnosti pro vápník. Buňky transfekované jednotlivými klony cDNA byly označeny fluorescenčně a jako pozitivní byl vybrán klon, který při aplikaci kapsaicinu vyvolal výrazné zvýšení koncentrace vápníku uvnitř buňky. Naklonovaný receptor byl označen jako vaniloidní receptor podtypu 1 (VR1). Izolace genu vaniloidního receptoru a jeho transfekce do nedráždivých buněk, jako jsou např. oocyty drápatky (*Xenopus laevis*) nebo buňky izolované z ledvin lidských embryí (HEK293) pěstované v podmínkách tkáňových kultur, umožnila získávat nové poznatky o struktuře a fyziologické funkci tohoto receptoru.

2.1.1 Distribuce TRPV1 receptoru

Původní vazebné studie využívající radioaktivně značený reziniferatoxin prokázaly přítomnost TRPV1 receptoru pouze na DRG neuronech a na neuronech trigeminálních ganglií (Szallasi et al., 1999). Později se podařilo dostatečně citlivými detekčními metodami prokázat, že poměrně velká distribuce TRPV1 může existovat v mozkové kůře, mozečku i různých subkortikálních strukturách, preoptické části hypotalamu, retikulární formaci a ventrálním talamu (Acs et al., 1996) (Mezey et al., 2000). Velký význam pro pochopení fyziologické úlohy TRPV1 receptoru měly studie na myších, u nichž byl genetickou manipulací vyřazen funkční gen pro kódování TRPV1 receptoru (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Tato „knock out“ zvířata (TRPV1^(-/-)) zcela ztratila citlivost ke kapsaicinu a nevyvinula se u nich přecitlivělost na tepelné podněty při experimentálně navozeném místním zánětu (tepelná hyperalgezie). Reakce na bolestivé mechanické podněty byly však nezměněny, což naznačilo, že TRPV1 na primárních nociceptorech nehraje úlohu mechanosenzitivního iontového kanálu. Z uvedených studií však bylo také zřejmé, že „knock out“ si zachoval překvapivě normální reakci zvířat na nocicepční teplo, což znamená, že musí existovat ještě jiné iontové kanály, které se účastní nocicepčního přenosu teplotní signalizace.

Imunohistochemickými a autoradiografickými vazebnými studiemi porovnávajícími kontrolní zvířata a experimentální myši s vyřazeným funkčním genem pro TRPV1 receptor byla jednoznačně prokázána exprese funkčních TRPV1 receptorů např. na tělech a dendritech neuronů, astrocytech a perivaskulárních strukturách uvnitř mozku (Roberts et al., 2004) (Toth et al., 2004) (Cristino et al., 2008). Je zajímavé, že v mozku byl prokázán výskyt TRPV1 receptoru společně s TRPV2 receptory, a to v

daleko vyšší míře než na DRG neuronech (Liapi and Wood, 2005). Skutečnost, že rozložení TRPV1 receptorů v mozku je ve srovnání s DRG neurony slabší (až 28 krát), zřejmě vedla k dlouhodobému podcenění jeho fyziologické úlohy v CNS. Hledání endogenních ligandů TRPV1 receptoru vedlo později ke zjištění, že některé endogenní lipidy strukturálně příbuzné vaniloidům, jež jsou produkovány v mozku a mohou aktivovat TRPV1 receptor, patří současně mezi agonisty kanabinoidních receptorů CB1 (anandamid a N-arachidonoyl-dopamin) (De Petrocellis and Di Marzo, 2005). Tyto metabotropní receptory jsou exprimovány společně s TRPV1 receptory v některých mozkových strukturách. Není však pravděpodobné, že by v mozku docházelo k aktivaci TRPV1 receptorů vyššími teplotami ($>43^{\circ}\text{C}$) nebo snížením pH, a proto se předpokládá, že se tonická aktivace TRPV1 receptorů, vyvolaná působením endogenních kanabinoidů, podílí na regulaci tělesné teploty (Marsch et al., 2007), souvisí se změnami v lokomoci a chování a podílí se na změnách synaptické plasticity v hipokampu (Gibson et al., 2008).

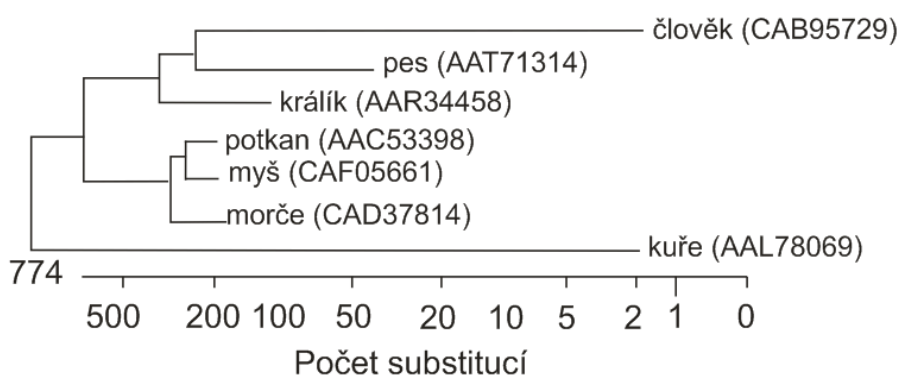
Vysoká hustota TRPV1 receptorů byla také zjištěna na centrálních vláknech DRG neuronů, která končí v zadních rozích míchy v oblasti lamina I a II, kde byly také detekovány TRPV1 na tělech astrocytů (Spicarova and Palecek, 2008). Je zajímavé, že hustota a rozmístění TRPV1 receptorů v míše se mění během vývoje. Novorození nebo několik dní staří potkani vykazují až třikrát vyšší expresi TRPV1 než dospělí jedinci, avšak receptory se nacházejí pouze v lamina I a jen velmi slabě v lamina II, ve které byly zaznamenány až s přibývajícím dnem po narození. Potkani staří zhruba 30 dní mají rozmístění a hustotu TRPV1 v míše srovnatelnou s výskytem u dospělých jedinců. Postupně přibývají důkazy naznačující, že TRPV1 receptory nacházející se v zadních rozích míchy hrají důležitou modulační úlohu v přenosu bolesti. Je nutno, aby bylo blíže určeno, do jaké míry je tato úloha důležitá u zdravých jedinců a při různých chronických bolestivých stavech.

2.1.2 Význam studia funkce TRPV1 receptoru ve vztahu k jeho struktuře

Molekulární identifikace vaniloidního receptoru TRPV1 v různých živočišných druzích umožnila nejen zajímavý evoluční pohled na možnou fyziologickou úlohu tohoto receptoru. Porovnání primárních struktur ortologních receptorů umožnilo rovněž

získat velmi důležitou informaci o funkčně významných oblastech uplatňujících se v detekci vnějších podnětů různých modalit (obr. 1).

Ukázalo se, že odlišná citlivost různých živočišných druhů ke kapsaicinu je dána strukturálními rozdíly mezi vazebnými místy, zatímco rozdíly v teplotní citlivosti mohou být odrazem odlišné struktury cytoplazmatického C konce (Vlachova et al., 2003).



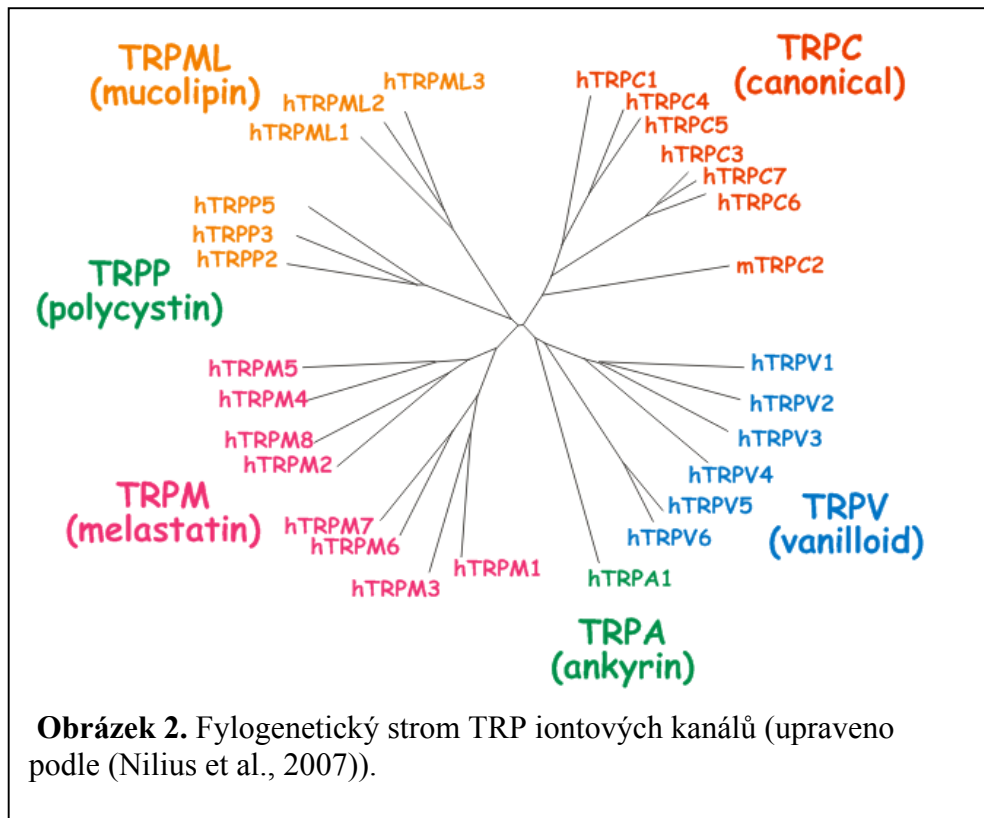
Obrázek 1. Fylogenetický strom příbuznosti TRPV1 receptoru pro různé živočišné druhy. Identifikační kódy jednotlivých ortologů odpovídají primárním sekvencím uvedených v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>). Pro porovnání sekvencí je použita Jotun Heinova metoda v programu Megalign, DNASTAR, člověk (Hayes et al., 2000), kuře (Jordt and Julius, 2002), králík (Gavva et al., 2004), potkan (Caterina, 2007), morče (Savidge et al., 2002), myš (Correll et al., 2004), pes (Phelps et al., 2005).

2.2 TRP receptory

2.2.1 Vaniloidní TRPV1 receptor v kontextu s ostatními TRP kanály

Vaniloidní receptor byl poprvé vyklonován z neuronů ganglií zadních kořenů míšních potkana funkční vyhledávací metodou pro různé klony komplementární DNA (Caterina et al., 1997). Byl nazván vaniloidním receptorem podtypu 1 (VR1) podle charakteristické skupiny látek - vaniloidů, které jej specificky aktivují. Na základě primární struktury byl zařazen do vaniloidní skupiny tzv. TRP (transient receptor

potential) iontových kanálů. Typická molekulární struktura TRP receptorů je tvořena šesti transmembránovými segmenty (S1-S6), jednou kratší hydrofobní kličkou mezi S5 a S6 (tzv. P-loop) a intracelulárně lokalizovanými N- a C-konci (obr. 4). Kromě popisu krystalové struktury ankyrinové části N-konců TRPV1 a TRPV2 receptorů (Jin et al., 2006; Lishko et al., 2007) a atypické kinázové domény N-konce TRPM7 receptoru (Yamaguchi et al., 2001) nemáme dosud k dispozici přímé strukturální údaje o žádném z TRP kanálů. Proto současné představy o mechanismech aktivace TRP receptorů vycházejí ze strukturně-funkčních studií a především z podobnosti jejich membránového uspořádání a vzdálené homologie s napěťově aktivovanými draslíkovými kanály (Doyle et al., 1998; Ferrer-Montiel et al., 2004; Voets et al., 2004a; Owsianik et al., 2005; Owsianik et al., 2006; Susankova et al., 2007).



2.2.2 Rozdělení TRP kanálů podle homologie primární struktury

Na rozdíl od tradičního členění ostatních iontových kanálů založeném na funkci, specifických ligandech nebo selektivitě, jsou TRP kanály klasifikovány podle

homologie primárních aminokyselinových sekvencí. Příčinou je nejen různorodost jejich biofyzikálních vlastností a komplexnost aktivačních a regulačních mechanismů, ale především skutečnost, že fyziologická úloha těchto receptorů dosud není často známa, a pouze se předpokládá, že jejich strukturální podobnost je podkladem existence společných mechanismů aktivace a modulace.

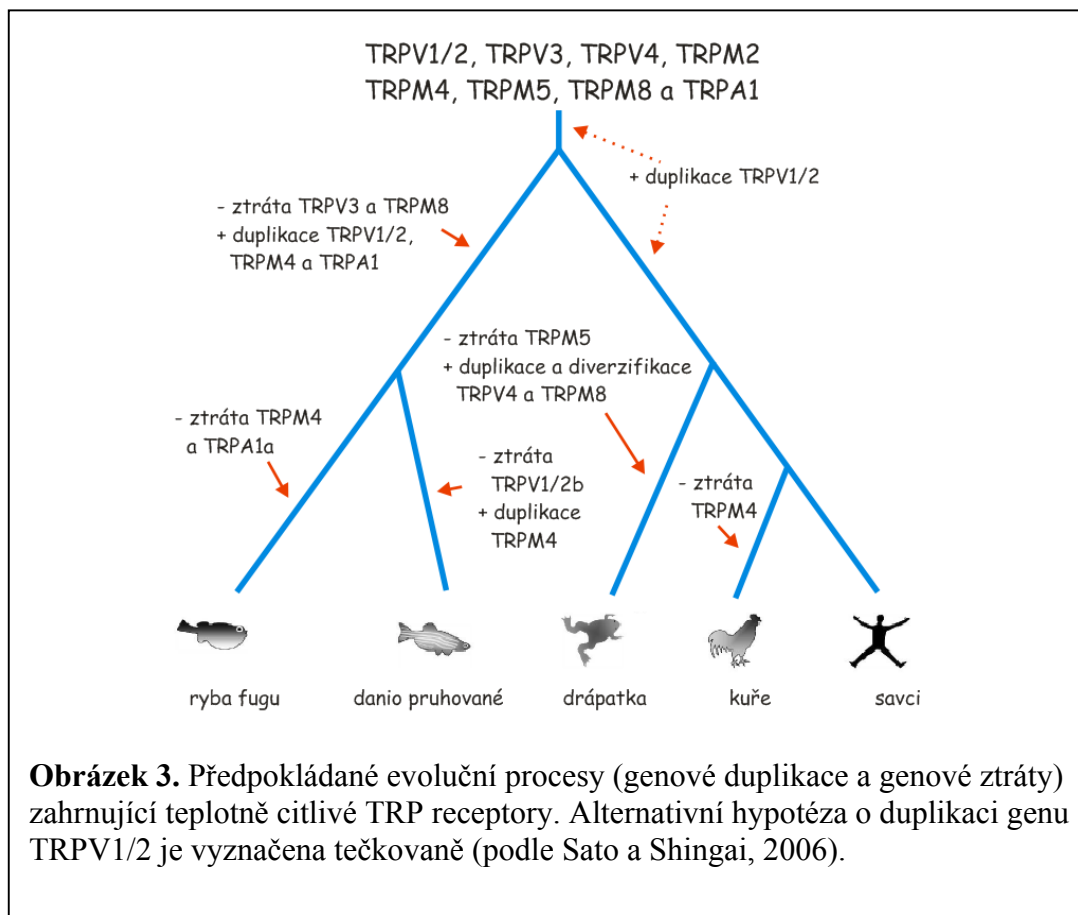
Podle současné nomenklatury jsou TRP kanály řazeny do dvou hlavních skupin na základě homologie primární struktury (Montell et al., 2002; Clapham et al., 2003; Clapham et al., 2005): Do *první skupiny* patří receptory podtypu: TRPM 1-8 (melastatinové), TRPC 1-7 (klasické, kanonické), TRPV 1-6 (vaniloidní), TRPA1 (ankyrinové). Do *druhé skupiny* jsou zařazeny iontové kanály TRPP 2,3,5 (polycystinové) a TRPML (mukolipinové), jež navíc obsahují velkou extracelulární klíčku mezi první a druhou transmembránovou doménou.

S výjimkou některých polycystinů (TRPP1, (Hanaoka et al., 2000)) je struktura TRP kanálů tvořena čtyřmi podjednotkami, přičemž hydrofobní klíčky mezi transmembránovými segmenty S5 a S6 se podílejí na vytvoření centrálního póru iontového kanálu. Součástí póru je selektivní filtr, jenž v závislosti na typu receptoru propouští jednomocné nebo dvojmocné kationty, často však kationty obou valencí. Modul póru iontového kanálu patří mezi nejvíce konzervované oblasti, což nasvědčuje tomu, že pro tyto iontové kanály existují společné principy selektivity, propustnosti a blokujících účinků některých nekompetitivních inhibitorů (ruteniové červeně nebo lanthanidů). Naproti tomu hydrofilní N- a C-koncové části jsou u všech TRP receptorů nejméně konzervované, a proto se předpokládá, že obsahují funkční domény, jež určují specifické vlastnosti jednotlivých podtypů receptorů (obr. 2).

Na základě fylogenetické analýzy a porovnáním primární struktury TRP receptorů u různých živočišných druhů (obr. 3) se zdá pravděpodobné, že během evolučního vývoje došlo k pozoruhodné specializaci těchto bílkovinných komplexů tak, že mohou měnit svou konformaci vlivem různých chemických i fyzikálních podnětů: světlem, změnami tlaku nebo osmolarity, teplem nebo chladem. TRP receptory nacházíme již u vývojově nejnižších organismů. Např. kvasinky jejich pomocí rozpoznávají osmolaritu vnějšího prostředí, hlístice (*Caenorhabditis elegans*) se vyhýbají škodlivým chemickým látkám a octomilky (*Drosophila melanogaster*) reagují na světelné podněty (pro přehled viz (Clapham, 2003) (Montell, 2005)). Savci prostřednictvím TRP receptorů rozpoznávají sladké a hořké chutě, teploty v rozsahu fyziologických i

patofyziologických hodnot a chemické látky, které u člověka vyvolávají bolest nebo ji zhoršují.

Ve snaze porozumět mechanismům aktivace a fyziologické funkci těchto iontových kanálů jsou vyhledávány funkční, strukturální a evoluční souvislosti mezi TRP receptory různých podskupin. Devět zástupců TRP třídy iontových kanálů, mezi něž patří i vaniloidní receptor podtypu 1, může být aktivováno změnami okolní teploty a pro některé z nich již bylo prokázáno, že hrají úlohu teplotních senzorů: TRPV1-4, TRPM2, 4 a 5 a TRPA1. Existují důkazy o tom, že mechanismy teplotní citlivosti se v průběhu evoluce obratlovců měnily závisle na prostředí, a proto porovnáním primární struktury homologních receptorů bychom mohli získat představu o molekulární podstatě teplotní aktivace (Latorre et al., 2007) (Saito and Shingai, 2006).



Je známo, že TRP kanály jsou neselektivní kationtové kanály propustné pro jednomocné i dvojmocné ionty s výjimkou TRPM4 a TRPM5, které propouštějí pouze jednomocné kationty. Většina je pouze slabě selektivní pro vápník s propustností

P_{Ca}/P_{Na} v rozmezí od 0,3 do 10. Výjimku tvoří kanály TRPV5 a TRPV6, které jsou pro vápník vysoce propustné ($P_{Ca}/P_{Na} > 100$). TRP kanály jsou aktivovány mnoha různými podněty, které zahrnují vazbu intra- a extracelulárních posílů, teplotní změny, chemické nebo mechanické stimuly. Uvažuje se také o tom, že některé TRP kanály jsou stále otevřené, kdežto jiné se otevírají v důsledku vyčerpání intracelulárních zásob vápníku. Předpokládá se, že některé TRP kanály jsou součástí membrán některých buněčných organel, ze kterých uvolňují vápník (např. TRPP2 je součástí endoplazmatického retikula).

2.2.3 Fyziologická úloha TRP iontových kanálů

TRP kanály hrají důležitou úlohu polymodálních buněčných sensorů, které jsou exprimovány na mnoha buňkách a tkáních lidského těla a účastní se regulace různých buněčných funkcí. Zásadním způsobem přispívají ke změnám intracelulární koncentrace vápníku, který se podílí na mnoha buněčných procesech, jako jsou například buněčná signalizace, kontrakce svalů, uvolňování přenašečů, buněčná proliferace nebo buněčná smrt. TRP kanály umožňují nejen přímý vstup vápníku do buňky z extracelulárního prostředí, ale podílí se i na uvolňování vápníku z intracelulárních zásob. Díky možnostem využití expresních systémů byl umožněn i intenzivní výzkum TRP kanálů zaměřený na vztahy mezi jejich funkcemi a lidskými nemocemi. Obecně je dnes známo, že poruchy funkcí iontových kanálů způsobené chybami v genetickém kódování (kanálopatie) jsou příčinou různých nemocí. Dosud bylo identifikováno pět typů kanálopatií, u kterých byl defekt TRP genů hlavní příčinou buněčných dysfunkcí. K podezření, že se některé TRP kanály podílejí také na vzniku dědičných chorob, přispělo zjištění TRP genů v částech chromozómů, které podléhají různým mutacím (např. translokace, bodové zlomy, polymorfismus). Také prokázaná patologická přítomnost jednotlivých typů TRP kanálů spolu se symptomy konkrétních nemocí naznačuje, že by se tyto kanály mohly podílet na vzniku některých chorob. Poruchy funkcí TRP kanálů vedou k zásadním změnám ve vápníkové signalizaci, přenosu informace o vstupu iontů do buňky, modulování elektrické aktivity vzrušivých buněk v mozku a srdci, poruchám ve zpětném vstřebávání iontů, funkci organel a chybám v proliferaci a růstu buněk. Bohužel zatím nejsou známy všechny možné mechanismy fyziologického působení TRP kanálů. Jejich výzkum je komplikován tím, že chemické látky produkované

v průběhu určitých nemocí mohou zásadním způsobem ovlivňovat funkci jiných typů iontových kanálů.

Při studiu TRP kanálů v souvislosti s konkrétní nemocí jde zpravidla o pochopení jejich základní úlohy a nalezení přístupů k vývoji nových léků zabraňujících patologickým účinkům jejich aktivity. Zatím však bylo objeveno pouze malé množství účinných prostředků se specifickými účinky. V tomto směru se pokročilo pouze u jediného člena ze skupiny TRPV kanálů – vaniloidního TRPV1 receptoru. Používání jeho antagonistů a látek s rychlým desenzitizujícím účinkem se využívá v léčbě bolesti a nemocí močového měchýře a gastrointestinálního traktu (Nilius et al., 2007).

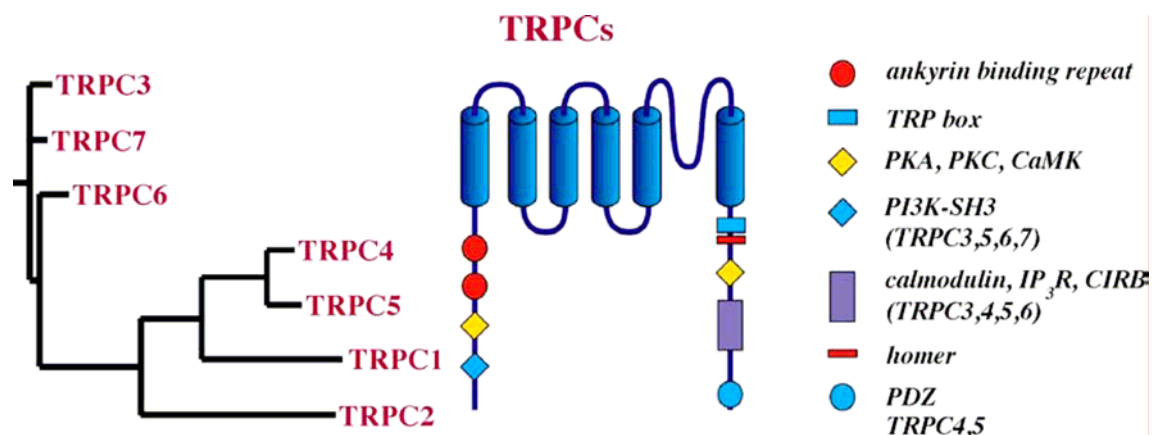
2.2.4 Základní charakteristiky TRP kanálů

Podobnost některých strukturálních a funkčních vlastností jednotlivých podskupin TRP receptorů v porovnání s vaniloidním TRPV1 receptorem a některé společné mechanismy jejich regulace vedou k získání cenných poznatků o možných nových fyziologických funkcích tohoto receptoru, a proto zde uvádíme podrobný přehled struktury a funkce jednotlivých TRP kanálů (Nilius et al., 2007).

První skupina TRP kanálů

TRPC podskupina

TRPC kanály se strukturou nejvíce podobají kanálům octomilky rodu *Drosophila melanogaster*, které byly identifikovány jako první zástupci TRP skupiny iontových kanálů. U jednotlivých zástupců této skupiny se významně liší míra propustnosti pro vápník. Významnou součástí jejich C konce je tzv. TRP box s konzervovanou sekvencí aminokyselin EWKFAR, která se účastní tetramerizace podjednotek. Na N konci se nachází ankyrinové oblasti s menší variabilitou v počtu (3 - 4) u jednotlivých zástupců. Uvažuje se, že by TRPC kanály mohly být aktivovány především stimulací fosfolipázy C (PLC), avšak tento mechanismus zatím zůstává sporný. Bylo např. prokázáno, že TRPC1 je přímo aktivován mechanickými změnami plazmatické membrány bez účasti fosfolipázy C (Maroto et al., 2005).



TRP kanál	Výskyt	Propustnost P _{Ca} /P _{Na}	Vodivost pS	Mechanismus aktivace	Vazební partneři
TRPC1	srdce, mozek, varlata, ovaria	neselektivní	16	PLC, OAG, mechanicky (tlak),	TRPC4, TRPC5, TRPP1, TRPC3 (embryo), Ca ²⁺ -ATPáza, CaM, IP ₃ R, enkurin, homer, caveolin-1, STIM1
TRPC2	vomerona-zální orgán, varlata	2,7	42	PLC, DAG	CaM, IP ₃ , enkurin, junctate
TRPC3	mozek	1,6	66	PLC, DAG, OAG, Src, IP ₃ , intracelulární Ca ²⁺	TRPC6, TRPC7, CaM, IP ₃ R, RyR, TrkB, NCX1, caveolin-1
TRPC4	mozek, endotel, nadledviny, sítnice, varlata,	1,1 - 7,7	30 - 41	PLC, GTPγS, microLa ³⁺	TRPC1, TRPC5, CaM, IP ₃ R, NHERF2, ZO-1
TRPC5	mozek	1,8 - 9,0	38 - 64	PLC, GTPγS, lysophosphatidylcholin (LPC), microLa ³⁺ a Gd ³⁺ , vyčerpání extracelulárního Ca ²⁺ ?, mírné zvýšení intracelulárního Ca ²⁺ , PIP5K, Rac, PI3K, MLCK	TRPC1, TRPC4, NCS-1, CaM, NHERF, enkurin, junctate, stathmin 2, synaptotagmin, MLCK, EBP50 (NHERF1), calbindin-28K
TRPC6	plíce, mozek	5	28 - 37	PLC, DAG, OAG, src TK, 20-HETE, AIFM flufenamate	TRPC3, TRPC7, CaM, FKBP12, Fyn, MxA

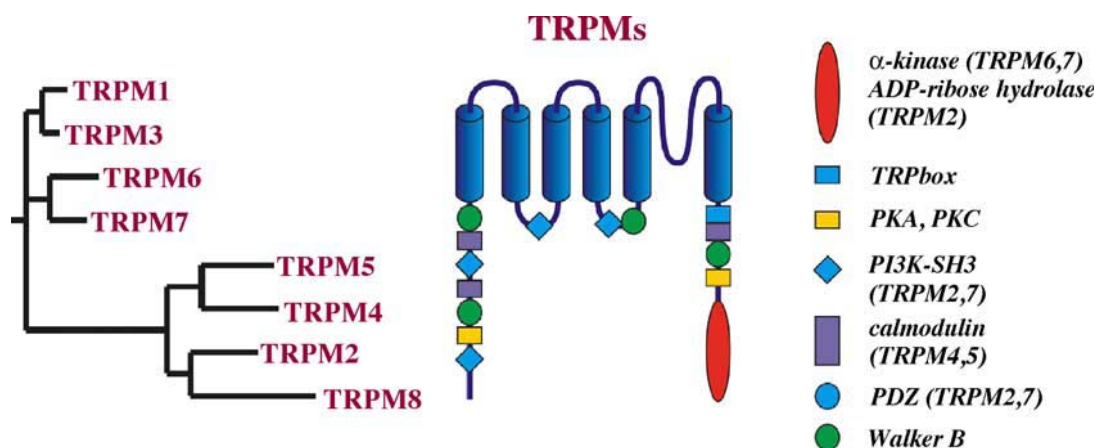
TRPC7	oči, srdce, plíce	2	75	PLC, DAG, OAG, 20-HETE	TRPC3, TRPC6, CaM, FKBP12
-------	-------------------	---	----	------------------------	---------------------------

Tabulka 1. Přehled výskytu, hlavních biofyzikálních charakteristik, mechanismů aktivace a některých vazebných partnerů TRPC receptorů (vysvětlivky v seznamu zkratk), převzato z (Nilius et al., 2007).

TRPM podskupina

Zástupce této skupiny bychom mohli ještě dále rozdělit do tří podskupin: TRPM1/3, TRPM4/5 a TRPM6/7, přičemž TRPM2 a TRPM8 mají ještě svá další specifika.

TRPM kanály se velmi odlišují nejen svou propustností pro různé ionty, ale i různými mechanismy své aktivace. Tyto kanály neobsahují na svých N koncích ankyrinové domény. Tři členové této skupiny obsahují na svých C koncích zajímavé domény: TRPM2 má funkční doménu NUDT9 a TRPM6 a TRPM7 obsahují α -kinázovou doménu (obsahuje serin a threonin).



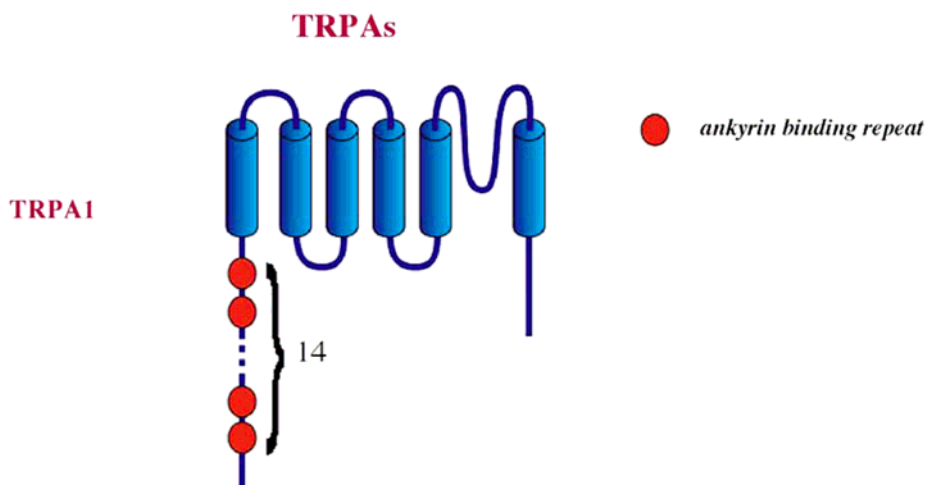
TRP kanál	Výskyt	Propustnost P_{Ca}/P_{Na}	Vodivost pS	Mechanismus Aktivace	Vazební partneři
TRPM1	oči	neurčeno	neurčeno	translokace, exprese vyvolaná MITF	TRPM1 – krátký transkript
TRPM2	mozek	0,5 - 1,6	52 - 80	ADP-ribóza, cADPR, NAD, teplo, H ₂ O ₂ , inhibice vyvolaná PARP-1	CaM
TRPM3	lid. ledviny, myší mozek	1,6 - 2,0	65 - 130	otok buněk, D-erythrosphingosine	neurčeno

TRPM4	prostata, tlusté střevo, srdce, ledviny	jednomocné ionty	25	zvýšená hladina intracelulárního Ca^{2+} , ATP, PKC, decavanadate, změna napětí, teplo, $PI(4,5)P_2$, BTP2	TRPM5, CaM
TRPM5	tenké střevo, játra, plíce, chuťové b.	jednomocné ionty	16 - 25	zvýšená hladina intracelulárního Ca^{2+} , změna napětí, teplo, $PI(4,5)P_2$	TRPM4
TRPM6	ledviny, tenké střevo	$P_{Mg}/P_{Na} \sim 6$	neurčeno	snížení intracelulárního Mg^{2+} , 2-APB	TRPM7
TRPM7	ledviny, srdce	3	40 - 105	snížení intracelulárního Mg^{2+} , $PI(4,5)P_2$, cAMP, G proteiny, smykové napětí, translokace membrány	TRPM6, přímá interakce s PLC
TRPM8	prostata, TG, DRG	1 - 3	83	depolarizace, chlad (8 – 28°C), mentol, icilin, Ca^{2+} , zvýšení intracelulárního pH, $PI(4,5)P_2$	fosfatázy, defosforylace zprostředkovaná PKC, PPI

Tabulka 2. Přehled výskytu, hlavních biofyzikálních charakteristik, mechanismů aktivace a některých vazebných partnerů TRPM receptorů (vysvětlivky v seznamu zkratk), převzato z (Nilius et al., 2007).

TRPA podskupina

Lidský TRPA1 kanál je zatím jediným molekulárně identifikovaným členem této podskupiny. Jeho N konec obsahuje 14 ankyrinových domén, díky kterým se tento iontový kanál zřejmě uplatňuje jako mechanosenzor (Nagata et al., 2005) (Lee et al., 2006). Byla zjištěna jeho aktivace bolestivým chladem (Story et al., 2003) (Sawada et al., 2007), tato vlastnost je však dosud předmětem diskuze a ani studie na „knockout“ myších nedokázala tuto domněnku potvrdit.



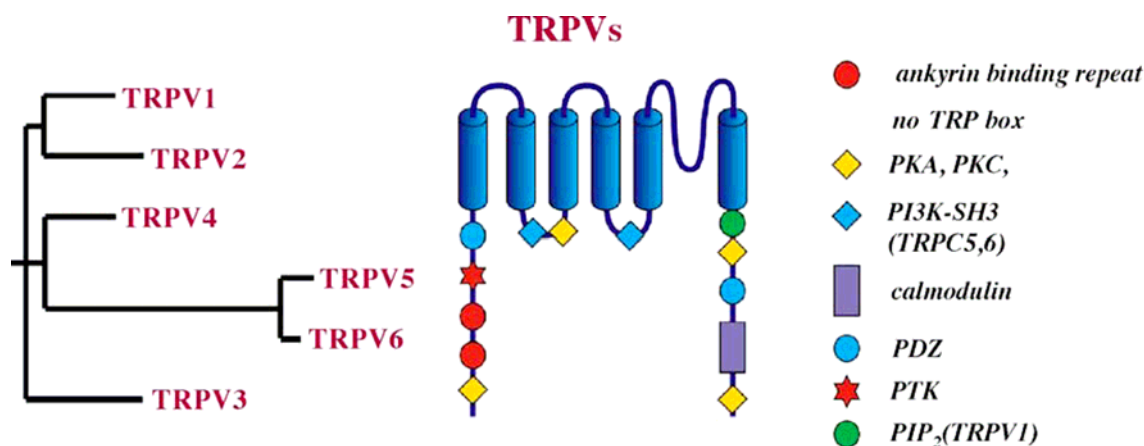
TRP kanál	Výskyt	Propustnost P_{Ca}/P_{Na}	Vodivost pS	Mechanismus aktivace	Vazební partneři
TRPA1	DRG, TG, vláskové buňky	0,8 - 1,4	40 - 105	isothiokyanáty, alicin, tetrahydrocannabinol (THC), cinnamaldehyd, bolestivé teplo?, mechanický tlak, změna napětí, OAG a arachidonová kyselina, receptorem zprostředkovaná aktivace PLC	TRPML2 TRPML3 CYCL TRPV1

Tabulka 3. Přehled výskytu, hlavních biofyzikálních charakteristik, mechanismů aktivace a některých vazebních partnerů TRPA1 receptorů (vysvětlivky v seznamu zkratk), převzato z (Nilius et al., 2007).

TRPV podskupina

První člen TRPV podskupiny TRP iontových kanálů byl získán z červa *Caenorhabditis elegans* (Colbert et al., 1997) a nazván Osm-9 podle své citlivosti k osmotickým podnětům, hmyzí ortolog byl nazván Nanchung (Nan, *Drosophila*) (Caterina et al., 1997). TRPV skupina obsahuje 6 savčích členů: TRPV1-6. Tyto receptory na N konci obsahují různý počet (3 – 6) ankyrinových domén. TRPV1-4 kanály jsou kationtové kanály slabě propustné pro vápník (P_{Ca}/P_{Na} 0.3-10). Působí jako chemosenzory pro širokou skupinu endogenních i exogenních ligandů. Kromě aktivace různými chemickými látkami jsou aktivovány teplem s různou prahovou hodnotou a některé jsou aktivovány i mechanickými podněty (tlak). V patologických podmínkách působí TRPV1-4 iontové kanály jako tzv. multimodální signální integrátory: např.

TRPV1 receptor je při zánětu aktivován chemickými a tepelnými podněty a přispívá tak k tomu, že člověk vnímá i lehce zvýšenou teplotu bolestivě.



TRP kanál	Výskyt	Propustnost P _{Ca} /P _{Na}	Vodivost pS	Mechanismus aktivace	Vazební partneři
TRPV1	TG, DRG, močový měchýř, struktury mozku, glie, keratinocyty jícna, žírné buňky, některé krevní buňky	~10 (proud vyvolaný kapsaicinem) ~4 (proud vyvolaný teplem)	35 - 80	depolarizace, teplo ($\geq 43^{\circ}\text{C}$), nízké pH, endovaniloidy, PKC, anandamid, 12-(S)-HPETE, 15-(S)-HPETE, 5-(S)-HETE, leukotrien B ₄ , spermin, 2-APB, OEA, PKA, snížení PI(4,5)P ₂	TRPA1, TRPV3?, CaM, PKC, PLC-TrkA, PP2B, calcineurin/cyklosporin, synaptotagmin, synaptogamin, FAF1
TRPV2	DRG, hřbetní mícha, slezina, střeva, cévní myocyty	1 - 3	neurčeno	bolestivé teplo ($\geq 53^{\circ}\text{C}$), mechanicky (tah, otok), růstový faktor, IGF-1 HA, 2-APB	PKA, RGA, ACDB3 (PAR7), dystrofinový glykoproteinový komplex
TRPV3	DRG, TG, keratinocyty, uzliny, hřbetní mícha, mozek	2,6	190	teplo (23-29°C), kafr, 2-APB, změna napětí	TRPV1?
TRPV4	ledviny, plíce, slezina, varlata, endotel, játra, srdce, DRG, keratinocyty	6 - 10	90	mírné teplo ($\geq 24^{\circ}\text{C}$), otok buněk, smykové napětí, PKC, anandamid, epoxyeikosatrienová kyselina, 4 α -	CaM, MAP7, NHERF2, SGK1, SGK3, BKCa, membránová inserce regulovaná glykosylací?,

				PDD, forboly	CFTR, aquaporin 5, Pacsin 3
TRPV5	ledviny, tenké střevo, slinivka břišní, placenta, prostata	≥ 100	75 (pro jednomocné kationy)	nízká hladina Ca^{2+} , hyperpolarizace, napětově závislá blokádá hořčíkem	TRPV6, CaM, S100A10, annexin II, NHERF4, calbindin
TRPV6	tenké střevo, slinivka břišní, placenta, prostata	≥ 100	40 – 70 (jednomocné kationy)	nízká hladina Ca^{2+} , hyperpolarizace, napětově závislá blokádá hořčíkem	TRPV5, CaM, S100A10, annexin II

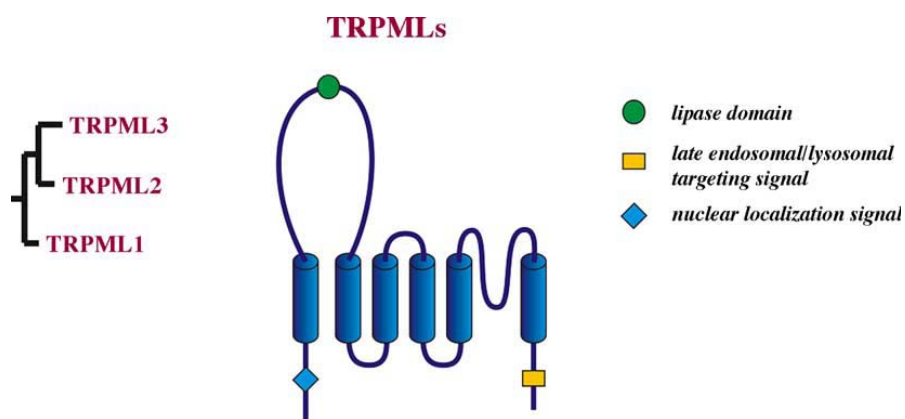
Tabulka 4. Přehled výskytu, hlavních biofyzikálních charakteristik, mechanismů aktivace a některých vazebných partnerů TRPV receptorů (vysvětlivky v seznamu zkratk), převzato z (Nilius et al., 2007).

TRPV5 a TRPV6 kanály se odlišují od ostatních členů této podskupiny vysokou propustností pro vápník ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$). Díky svým vlastnostem hrají klíčovou úlohu v přenosu vápníku v epitelích a v některých nedráždivých buňkách. Oproti ostatním kanálům TRPV skupiny jsou tyto receptory málo citlivé na tepelné podněty (Nilius, 2007).

Druhá skupina TRP kanálů

TRPML skupina

Tuto málo početnou skupinu tvoří tři savčí zástupci, jejichž primární struktura obsahuje méně než 600 aminokyselinových zbytků. Extracelulární klička mezi první a druhou transmembránovou doménou obsahuje lipázovou doménu, jejíž funkce zatím není přesně známa, ale mohla by být enzymaticky aktivním místem, nebo vazebným místem pro lipidy, které by se mohly uplatňovat v regulaci funkce těchto kanálů. O TRPML1 obsaženém v lysozomech se uvažuje jako o H^+ kanálu, který reguluje množství vodíkových iontů uvnitř organely a zabraňuje tak překyselení nitrobuňčného prostoru. O funkci TRPML2 a 3 zatím není mnoho známo.



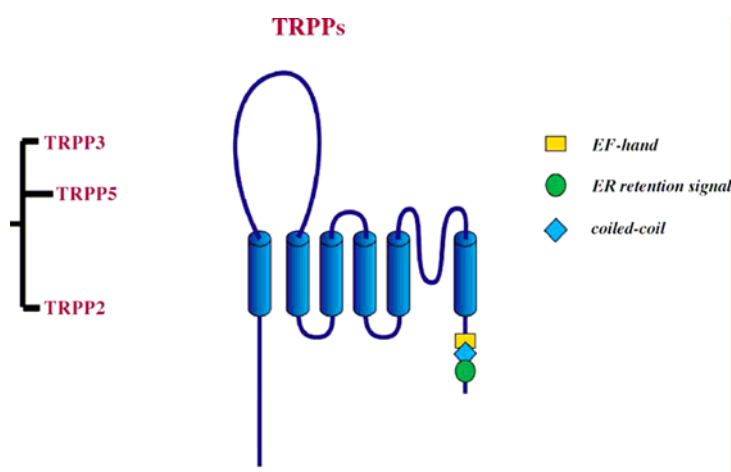
TRP kanál	Výskyt	Propustnost P_{Ca}/P_{Na}	Vodivost pS	Mechanismus aktivace	Vazební partneři
TRPML1	mozek, srdce, kosterní svalovina	~ 1 , H^+	46 - 83	zvýšená hladina intracelulárního Ca^{2+} , inhibice proteolytickým štěpením	neurčeno
TRPML2	neurčeno	neurčeno	neurčeno	neurčeno	TRPA1
TRPML3	vláskové buňky hlemýždě	neurčeno	neurčeno	neurčeno	TRPA1

Tabulka 5. Přehled výskytu, hlavních biofyzikálních charakteristik, mechanismů aktivace a některých vazebních partnerů TRPML receptorů (vysvětlivky v seznamu zkratk), převzato z (Nilius et al., 2007).

TRPP podskupina

Tato skupina kanálů je velice nehomogenní a podle strukturálního hlediska může být dále rozdělena na dvě skupiny: TRPP1-like (dříve PKD1-like) a TRPP2-like (dříve PKD2-like) kanály. Mezi TRPP1-like kanály patří: TRPP1 (dříve PKD1), PKDREJ, PKD1L1, PKD1L2 a PKD1L3. Jejich zařazení mezi TRP kanály je zatím předběžné a je předmětem dalších studií. TRPP1 kanál je vytvářen 11 transmembránovými doménami a velmi dlouhým N koncem uloženým extracelulárně, který obsahuje několik domén podílejících se pravděpodobně na mezibuněčných interakcích. Extracelulární klička TRPP1-like kanálů obsahuje konzervované polycystinové motivy, jejichž funkce není známa a je umístěna mezi šestou a sedmou doménou, což je homologní s extracelulární kličkou TRPP2-like kanály. TRPP2-like kanály mají základní molekulární strukturu shodnou s ostatními TRP kanály (tj. 6 transmembránových domén, intracelulárně

orientované N a C konce). Patří sem: TRPP2 (dříve PKD2), TRPP3 (dříve PKD2L1) a TRPP5 (dříve PKD2L2). Všichni zástupci této skupiny mají na svém C konci *coiled-coil* strukturu a vytvářejí polymodální multiproteinové komplexy iontových kanálů (Delmas, 2005). TRPP2 a TRPP3 mají na svém C konci *EF-hand* motiv (strukturálně vazebná doména pro Ca^{2+}), ale zatím není jasné, zda díky němu uplatňuje vápník svůj regulační vliv na TRPP2. V heterologních systémech vytvářejí TRPP2 a TRPP3 selektivní kationtové kanály s vysokou vodivostí.



TRP kanál	Výskyt	Propustnost P_{Ca}/P_{Na}	Vodivost pS	Mechanismus aktivace	Vazební partneři
TRPP2	ledviny (široce rozšířen)	1 - 5	40 - 177	mechanické napětí, intracelulární Ca^{2+}	TRPP1, typ I IP_3R , TRPV4?, TRPC1
TRPP3	ledviny, srdce	4	137	intracelulární Ca^{2+}	neurčeno
TRPP5	varlata, srdce	1 - 5	300	intracelulární Ca^{2+}	neurčeno

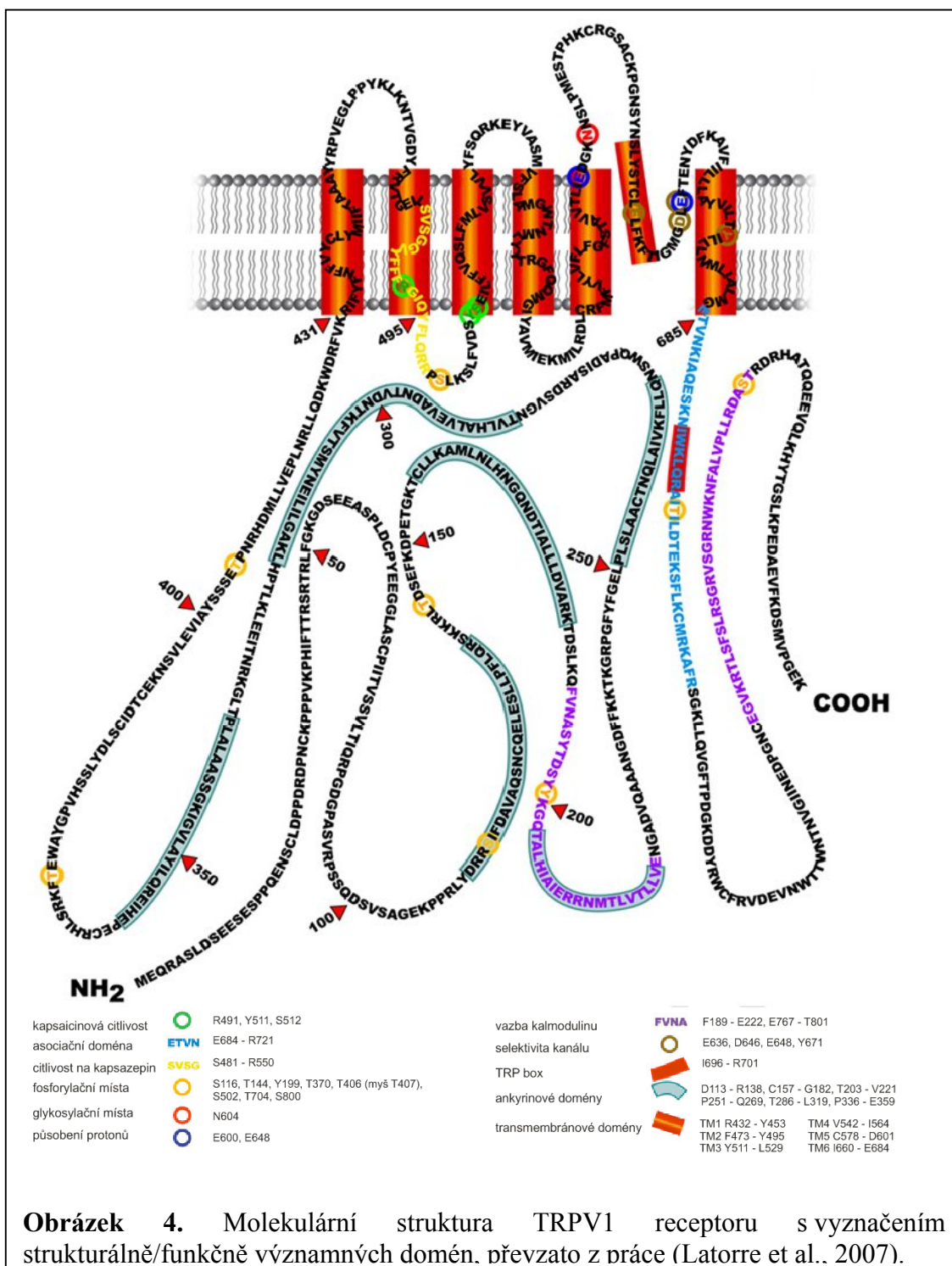
Tabulka 6. Přehled výskytu, hlavních biofyzikálních charakteristik, mechanismů aktivace a některých vazebných partnerů TRPP receptorů (vysvětlivky v seznamu zkratk), převzato z (Nilius et al., 2007).

2.3 Struktura TRPV1 receptoru

V této dizertační práci byl studován potkaní TRPV1 receptor (rTRPV1 receptor). Jde o protein o velikosti 95 kDa, který je kódován komplementární DNA (cDNA) o velikosti 2 514 nukleotidů, což představuje 838 aminokyselin, tvořících šest transmembránových domén (struktury α -helixu) a dva aminokyselinové konce uložené intracelulárně. Funkční domény TRPV1 receptoru, jejichž význam je v současné době charakterizován, jsou přehledně uvedeny v tabulce 7 a obrázku 4. Mezi pátou a šestou doménou je kratší hydrofobní klička. Aminokyselinový řetězec (N konec) je tvořen 400 aminokyselinovými zbytky. Obsahuje oblasti bohaté na prolin a šest ankyrinových domén, které ho spojují s cytoskeletem a pravděpodobně několika malými intracelulárními peptidy, z nichž nejvýznamnější úlohu hraje kalmodulin. Kratší řetězec s karboxylovou skupinou (C konec) je tvořen 154 aminokyselinami a obsahuje TRP doménu v blízkosti šesté transmembránové domény. Předpokládá se, že vaniloidní receptor TRPV1, podobně jako ostatní TRP kanály, je homotetramerem, v němž kratší hydrofobní kličky čtyř podjednotek vytvářejí pór představující selektivní filtr iontového kanálu (Clapham et al., 2001) (Jahnel et al., 2001; Kedei et al., 2001). Heteromery může TRPV1 receptor tvořit s TRPV3 receptorem (Smith et al., 2002) (Cheng et al., 2007) nebo TRPV2 receptorem (Liapi and Wood, 2005) (Rutter et al., 2005).

	N- konec	Membránové úseky	C- konec
Transmembránové domény		I. R432 - Y453 II. F473 – Y495 III. Y511 – L529 IV. V542 – I564 V. C578 – D601 VI. I660 – E684	
Ankyrinové domény	I. D113 - R138 II. C157 – K182 III. T203 – V221 IV. P251 – Q269 V. T286 – L319 VI. P336 – E359		
Vazba kapsaicinu	R114	R491, Y511, S512, M547, T550	E761
Vazba kapsazepinu		S481 – R550	
PKA fosforylace	S116, T144, T370		S774, S820
PKC fosforylace		S502	T704, S800
CaMK II fosforylace		S502	T704
Vazba CaM	F189 - E222		E767 - T801
Vazba ATP	WalkerB doména 171 - 185		WalkerA doména 726 -F740
N glykozylace		N604	
pH aktivace		E478, E536, E600, D601, E648	
TRP doména TRP box			E684 – R721 I696 – R701
Místa spojená s propustností		E636, D646, E648, Y671	
Vazba PIP ₂			777 - 820

Tabulka 7. Významné funkční domény rTRPV1 receptoru.



2.4 Sestřihové varianty TRPV1 receptoru

TRPV1 receptor se vyskytuje v několika sestřihových variantách. 5'koncová sestřihová varianta TRPV1 (VR.5' sv) má ve srovnání s vaniloidním receptorem odstraněnu větší část N-konce a začíná až od jeho 588. aminokyseliny, jinak je s ním v celém rozsahu shodná. Zdá se, že absence velké části N konce receptoru významně poznamenala jeho funkčnost, neboť není citlivý na žádný z typických podnětů TRPV1, jakými jsou kapsaicin, nízké pH a bolestivé teplo. Tento protein se vyskytuje na DRG neuronech, v mozku, lymfocytech a žírných buňkách (Schumacher et al., 2000a).

Další sestřihovou variantou TRPV1 receptoru je SIC kanál (stretch inactivated channel), který v porovnání s TRPV1 neobsahuje N-koncovou část receptoru a odlišuje se i v oblasti C-konce. Skládá se z 563 aminokyselin, není citlivý ke kapsaicinu ani nízkému pH, je však aktivován zvýšeným osmotickým tlakem, takže se pravděpodobně může uplatňovat jako mechanický senzor. SIC se vyskytuje nejen v nervové tkáni (DRG neurony, mozek), ale i v somatických buňkách (ledviny, játra) (Suzuki et al., 1999; Schumacher et al., 2000b).

Velmi krátkou sestřihovou variantou TRPV1 receptoru je tzv. TRPV1_{VAR}, který obsahuje pouze 253 aminokyselin, a jenž byl izolován z ledvinové papily potkana. Interakcí s vaniloidním receptorem se pravděpodobně může podílet na modulaci jeho aktivity (Tian et al., 2006).

TRPV1b sestřihová varianta vaniloidního receptoru tvoří funkční iontový kanál, který se však od TRPV1 výrazně odlišuje ve své aktivaci: je citlivý k teplotě až s prahovou hodnotou ≥ 47 °C a nelze ho aktivovat ani kapsaicinem ani nízkým pH. Určitý podíl na těchto změněných vlastnostech může mít jeho o 60 aminokyselin zkrácený N-konec (Lu et al., 2005; Vos et al., 2006).

U myši byly popsány dvě sestřihové varianty TRPV1 α a TRPV1 β . TRPV1 α se skládá z 839 aminokyselin, vyskytuje se v mnoha tkáních a představuje funkční iontový kanál, který lze aktivovat známými aktivátory TRPV1 receptoru. Oproti tomu TRPV1 β je tvořen 829 aminokyselinami a byl nalezen převážně na DRG neuronech, kůži, žaludku a tonsilách. Tato varianta není funkční a pokud je exprimována spolu s TRPV1 α , dokonce tlumí její aktivitu. Přestože se obě varianty syntetizují stejně

rychle, bylo uvnitř buněk i na jejich povrchu nalezeno daleko méně TRPV1 β variant, což dokazuje její vysokou nestabilitu (Wang et al., 2004a).

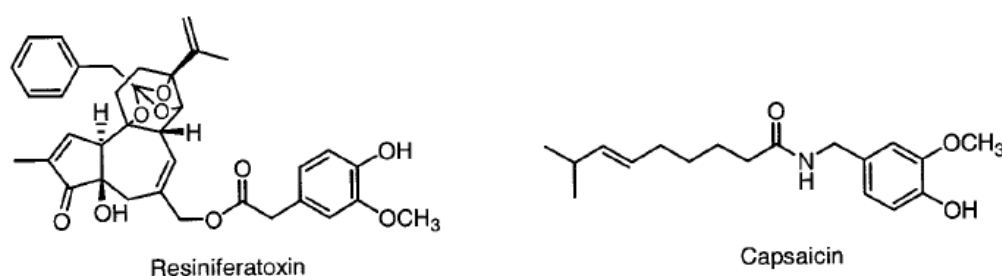
2.5 Mechanizmy aktivace TRPV1 receptoru

2.5.1 Chemické aktivátory

2.5.1.1 Exogenní aktivátory

Vaniloidy

Specifickými exogenními agonisty savčího vaniloidního receptoru jsou silně lipofilní látky kapsaicin a reziniferatoxin.



Obrázek 5. Strukturální vzorec kapsaicinu a reziniferatoxinu

Kapsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamid) se nachází v určitých druzích pálivých paprik. Aplikován na kůži nebo sliznici vyvolává u člověka štiplavě pálivé pocity. Jeho tisíckrát účinnějším analogem je reziniferatoxin (RTX), diterpenoid izolovaný ze sukulentu *Euphorbia resinifera*, který má s kapsaicinem shodnou chemickou homovanillyl (3-methoxy 4-hydroxybenzyl) skupinu. Chemická struktura kapsaicinu obsahuje tři funkční části: aromatickou část reprezentovanou homovanillyl skupinou, spojovací část tvořenou esterem a část představující alifatický řetězec o délce zpravidla osmi až deseti atomů uhlíku (Walpole et al., 1993a, 1993c; Walpole et al.,

1993b). A a B části obsahují bipolární skupiny (hydroxylovou a karboxylovou), díky nimž jsou hydrofilní a vytvářejí vodíkové vazby. Alifatický řetězec se na základě své lipofilní povahy zřejmě účastní hydrofobních interakcí (Szallasi et al., 1999). Mezi vaniloidní látky patří také např. zingeron, výtažek z hlíz zázvoru se štiplavě pálivým účinkem podobně jako má kapsaicin, a olvanil, synteticky vyrobený vysoce lipofilní vaniloid bez pálivého účinku (Liu and Simon, 1998).

Dlouho převládal názor, že se kapsaicin váže na TRPV1 receptor z intracelulární strany buněčné membrány a že k jeho účinnému navázání je zapotřebí jeho průchod plazmatickou membránou z vnějšího prostředí (Oh et al., 1996) (Jordt and Julius, 2002), ale současné poznatky dokazují, že k aktivaci receptoru je zapotřebí i jeho vazba z extracelulární strany receptoru (Vyklícky et al., 2003; Gilbert et al., 2007). Na chemické aktivaci TRPV1 receptoru kapsaicinem se alostericky podílí řada intracelulárních domén, např. hydrofobní klička mezi 5. a 6. transmembránovým segmentem (glutamát E636, asparagin N646 a glutamát E648; (Welch et al., 2000)) a oba cytoplazmaticky orientované konce (Jung et al., 2002; Vlachova et al., 2003). Při analýze mezidruhových rozdílů v homologii vaniloidního receptoru kuřete, který je necitlivý ke kapsaicinu, a potkana, který je ke kapsaicinu citlivý, byl zjištěn klíčový význam aromatického tyrozinu (Y511), který se v oblasti první intracelulární kličky mezi druhou a třetí transmembránovou doménou účastní vazby s aromatickou homovanillyl skupinou kapsaicinu. Úlohu při této vazbě zřejmě hrají i další dva aminokyselinové zbytky serin (S512) a arginin (R491), jež vytvářejí s kapsaicinem vodíkové můstky (Jordt and Julius, 2002).

Na základě výsledků pokusů, ve kterých byly postupně zkracovány N a C konce vaniloidního receptoru a konstruovány chiméry TRPV1 a TRPV2 receptorů (Jung et al., 2002), bylo prokázáno, že pro rozpoznání ligandu je nezbytná i přítomnost záporně nabitého glutamátu (E761) na C-konci receptoru a pozitivně nabitého argininu (R114) na N-konci receptoru. Vazby kapsaicinu a reziniferatoxinu se zřejmě také účastní dva aminokyselinové zbytky ve čtvrté transmembránové doméně: polární T550 a nepolární M547 (Gavva et al., 2004). Mezi potkaním a lidským TRPV1 receptorem existují farmakologické rozdíly na nichž by se mohl podílet aminokyselinový zbytek v pozici 547: methionin u potkana, kdežto leucin u člověka (Chou et al., 2004).

Exogenní aktivátory nepatřící mezi vaniloidy

Schopnost aktivovat TRPV1 receptor prokázaly také některé další látky, které strukturálně nepatří k vaniloidům. Alicin aktivuje receptor pouze jako výtažek z čerstvého česneku a je zcela neúčinný pokud byl česnek jakkoliv tepelně upraven (Macpherson et al., 2005) (Salazar et al., 2008). Piperin, alkaloid z bobulí černého pepře *Piper nigrum*, má nižší afinitu, ale vyšší účinnost k vaniloidnímu receptoru než kapsaicin (McNamara et al., 2005) (Szallasi, 2005). Kafr izolovaný z kastrovníku *Cinnamomum camphora* aktivuje TRPV1 receptor, avšak ve srovnání s kapsaicinem v daleko vyšší koncentraci a zřejmě nezávisle na vazebném místě pro kapsaicin (Xu et al., 2005). Syntetickým aktivátorem TRPV1 (ale také TRPV2 a TRPV3) receptoru je 2-aminoetoxydifenyl borát (2-APB), jehož nízké koncentrace silně potencují účinky kapsaicinu, nízkého pH a tepla (Hu et al., 2004).

TRPV1 receptor může být také aktivován látkami typu rozpouštědel např. etanolem, jehož účinek se projeví již v koncentracích ≥ 0.3 % (Trevisani et al., 2002) (Benedikt et al., 2007).

Vanilotoxiny

Mezi aktivátory vaniloidního receptoru se v nedávné době zařadily vanilotoxiny, VaTx1, VaTx2 a VaTx3, jedovaté látky izolované z pavouka *Psalmopoeus cambridgei* žijícího v západní Indii. Jde o skupinu tří příbuzných peptidů, skládajících se z 34 nebo 35 aminokyselinových zbytků a C konce. Svým aktivačním účinkem na TRPV1 receptor jsou výjimečné neboť svou strukturou patří do skupiny tzv. ICK peptidů, které působí jako inhibitory iontových kanálů (Siemens et al., 2006). ICK peptidy jsou obsaženy v různých kmenech živočichů, rostlin i hub a předpokládá se, že jsou nejvýznamnější složkou jedů pavouků, škorpiónů a mořských plžů (Zhu et al., 2003).

2.5.1.2 Endogenní ligandy a aktivátory TRPV1 receptoru (endovaniloidy)

Intenzivní snaha poznat fyziologickou funkci TRPV1 receptoru vedla k vyhledávání endogenních látek, které by se chemickou strukturou podobaly exogenním vaniloidům a mohly by hrát úlohu přirozených aktivátorů na nociceptivních

neuronech. Přestože byla pro některé látky skutečně prokázána schopnost aktivovat TRPV1 receptor prostřednictvím vazebného místa pro kapsaicin, jejich účinnost je často nižší, než by se dalo očekávat od plného agonisty. Bylo však také postupně zjištěno, že maximální aktivace TRPV1 iontového kanálu je dosaženo zpravidla společným synergickým působením více aktivátorů: vaniloidů, protonů či zvýšené teploty (Tominaga et al., 1998; Vlachova et al., 2001; Vlachova et al., 2002b). Z těchto poznatků bylo tedy zřejmé, že endogenní ligandy v koncentracích vyskytujících se přirozeně v organismu mohou aktivovat TRPV1 receptor *in vivo*, avšak ve vzájemné kombinaci a za současného působení změn teploty v organismu.

Snížené pH extracelulárního prostředí

V místech poraněné, zanícené nebo ischemické tkáně dochází ke snížení pH. Tato lokálně zvýšená koncentrace protonů reguluje TRPV1 receptor dvěma odlišnými mechanismy. Při nižších koncentracích protonů (pH 7,0 – 6,0) jsou potencovány membránové proudy vyvolané aktivací TRPV1 receptorů kapsaicinem nebo teplem a dochází k posunu teplotního prahu k nižším hodnotám (Caterina et al., 1997). Při vyšších koncentracích (pH \leq 5,9) extracelulární protony přímo aktivují vaniloidní receptor (Tominaga et al., 1998). Kromě aktivačních a modulačních účinků mohou protony přímo procházet pórem vaniloidního receptoru a dochází tak k acidóze neuronů (Hellwig et al., 2004). Na základě mutačních analýz byly odhaleny dva záporně nabitě aminokyselinové glutamátové zbytky v oblasti póru iontového kanálu, které protony svým kladným nábojem neutralizují, čímž dochází k aktivaci receptoru. Glutamát v pozici 600 (E600) je důležitým regulačním místem pro potenciaci proudových odpovědí vyvolaných kapsaicinem nebo teplem, kdežto glutamát v pozici 648 (E648) se přímo účastní aktivace (Jordt et al., 2000).

Lanthanidy regulují aktivitu vaniloidního receptoru podobně jako protony. Naše studie prokázala, že trojmocné gadolinium (Gd^{3+}) interaguje s glutamátovými zbytky v póru kanálu. Glutamát E600 má rozhodující místo pro aktivaci receptoru, kdežto glutamát 648 se uplatňuje při potenciaci kapsaicinem vyvolaných membránových proudů. Při vyšších koncentracích (\geq 100 μ M) lanthanidy TRPV1 kanál blokuje (Tousova et al., 2005).

Přirozené polyaminy

Přirozené polyaminy spermin (tetraamin), spermidin (triamin) a putrescin (diamin) reprezentují specifickou třídu endogenních ligandů TRPV1 receptoru, které podobně jako protony aktivují TRPV1 receptor z vnější strany plazmatické membrány. Hojně se vyskytují v lidském těle a jsou nezbytné především pro proliferaci a růst buněk. Jsou důležitými endogenními regulátory iontových kanálů a při zánětu se uplatňují při přenosu signalizace o bolestivém dráždění (Zhang et al., 2000). Bylo prokázáno, že polyaminy svým kladným nábojem neutralizují aminokyselinové zbytky aspartát v pozici 646 a glutamát v pozici 648, které jsou uloženy v póru kanálu, čímž přímo aktivují iontový kanál (Ahern et al., 2006).

Mediátory zánětu

Vaniloidní receptor je významně aktivován také vzájemnou kombinací mediátorů zánětu, především bradykininu, serotoninu a prostaglandinu E₂, které se uvolňují do okolí z poraněné tkáně, kde je značně sníženo pH (z fyziologického pH 7.3 až na hodnotu 5.5) (Vyklícky et al., 1998). V mnoha případech je účinek mediátorů zánětu na TRPV1 receptorech zprostředkovan nepřímou, aktivací metabotropních receptorů a druhými posly např. EP₂, EP₄, NK₁ apod. (viz kapitola 2.6.1).

Anandamid

První endogenní látkou, u které byly splňovány předpoklady, že díky své strukturální podobnosti s kapsaicinem může aktivovat TRPV1 receptor prostřednictvím vazebného místa pro kapsaicin, je arachidonyletanolamid neboli anandamid (AEA), bioaktivní lipid strukturálně podobný arachidonové kyselině (Zygmunt et al., 1999). Tato látka byla původně objevena jako první agonista kanabinoidních receptorů CB1 a CB2 po té, co byla izolována z prasečích mozků (Devane et al., 1992). Její biosyntéza byla dále prokázána na neuronech, makrofázích a mnoha dalších tkáních.

Lipoxigenázové produkty kyseliny arachidonové

Některé produkty kyseliny arachidonové jsou schopny aktivovat TRPV1 receptor, což bylo prokázáno v pokusech na izolovaných terčících DRG neuronů i v heterologním expresním systému. Ve zvýšené míře se nacházejí v zánícené tkáni, podílejí se na procesech vedoucích k hyperalgezi a často plní úlohu intracelulárních posílů. Nejúčinnější z nich jsou: 12-(S)- a 15-(S)-HPETE (hydroperoxyeikosatetraenové kyseliny), 5- a 15-HETE (hydroeikosatetraenové kyseliny) a leukotrien LB4 (Hwang et al., 2000).

N-acyldopaminy

Podle podobnosti své chemické struktury (přítomnost katecholaminové skupiny podobné homovanilyl skupině vaniloidů) a účinnosti podobné kapsaicinu u savců (potkan a kráva) byl jako první mezi endogenními agonisty TRPV1 receptoru zařazen N-arachidonyldopamin (NADA). Podobně jako anandamid je také NADA aktivátorem kanabinoidních receptorů typu CB1. Vyskytuje se ve vysoké koncentraci v některých oblastech mozku (striatum, hipokampus, mozeček) a v nižší koncentraci též v neuronech zadních kořenů míšních, kde účinně působí v dávkách, jež jsou asi desetkrát nižší než dávky jiných endogenních agonistů (Huang et al., 2002). Účinnost N-arachidonyldopaminu se zvyšuje je-li TRPV1 receptor fosforylován (Premkumar et al., 2004). Společně s N-arachidonyldopaminem se v savčím mozku vyskytují další sloučeniny, které působí na TRPV1 receptor. N-oleoyldopamin (OLDA) silně aktivuje vaniloidní receptor vyskytující se jak v periferním tak v centrálním nervovém systému a může se podílet na vyvolání teplotní hyperalgie (Chu et al., 2003; Szolcsanyi et al., 2004). N-palmitoyldopamin (PALDA) a N-stearoyldopamin (STEARDA) sami o sobě neaktivují (nebo velmi slabě aktivují) TRPV1 receptor, avšak potencují účinky arachidonyldopaminu a anandamidu (Chu et al., 2003). V oblastech s nízkým pH (6.0 – 6.7) zvyšují hladinu intracelulárního vápníku. Těmito tzv. „doprovodnými“ účinky se tyto látky pravděpodobně podílí na procesech zánětlivé a neuropatické bolesti (De Petrocellis et al., 2004).

Dvěma novými kandidáty endogenních aktivátorů TRPV1 receptoru jsou 3-HETE (3-hydroxyeikosatetraenová kyselina), metabolit kyseliny arachidonové produkovaný

houbou *Candida albicans*, a 3-hydroxyanandamid (3-hydroxy-AEA) (Starowicz et al., 2007).

Z publikovaných studií vyplývá, že by se endovaniloidy mohly podílet na důležitých fyziologických a částečně i patologických dějích nejen v periferním a centrálním nervovém systému, ale i v ostatních tkáních. Je diskutován i možný podíl TRPV1 receptoru a endovaniloidů v mozku v souvislosti se zprostředkováním pocitů úzkosti a strachu (Marsch et al., 2007).

Omega-3-mastné kyseliny

Pro vlastní funkci neuronů má zřejmě zásadní význam i skupina strukturálně odlišných omega-3 nenasycených mastných kyselin (n-3 PUFAs), jejichž hlavním zdrojem je mateřské mléko, rostlinné oleje (např. řepkový) a maso tučných ryb. Jedná se především o kyselinu eikosapentaenovou (EPA), dokosahexaenovou (DHA) a linolenovou (LNA), které mají kromě jiných účinků na lidské tělo (např. obranyschopnost organismu, prevence srdečně-cévních onemocnění nebo prevence Alzheimerovy choroby) také analgetické vlastnosti. Podstata jejich signalizačního mechanismu není dosud jasná. DHA se podílí především na tvorbě struktury buněčných membrán (~50%) centrálních neuronů (Marszalek and Lodish, 2005) a při jejím nedostatku dochází k neurologickým poruchám především v oblasti paměti, zrakového a sensorického systému (Salem et al., 2001). Omega-3 nenasycené mastné kyseliny přímo aktivují TRPV1 receptor v závislosti na jeho fosforylaci prostřednictvím proteinkinázy C a inhibují membránové proudy vyvolané vaniloidy (Matta et al., 2007).

2.5.2 Fyzikální aktivátory

2.5.2.1 Aktivace TRPV1 receptoru teplem

TRPV1 receptor byl prvním iontovým kanálem, u kterého byla prokázána schopnost přímé aktivace změnami okolní teploty. Membránové proudy vyvolané zvýšením teploty nad 43°C na malých DRG neuronech (Cesare and McNaughton, 1996) a proudy zprostředkované rekombinantním vaniloidním receptorem TRPV1 (Caterina et

al., 1997) (Tominaga et al., 1998) jsou charakteristické vysokým teplotním koeficientem (~ 25) v teplotním rozmezí 43-50°C (Vyklícky et al., 1999). Tato jedinečná biofyzikální vlastnost proteinového komplexu TRPV1 kanálu vyvolala otázku zda vysoká teplotní citlivost TRPV1 receptoru může hrát fyziologickou úlohu na nociceptorech v přímém rozpoznávání teplot, které jsou člověkem vnímány jako bolestivé. Pozdější studie prokázaly, že TRPV1 receptor skutečně hraje klíčovou úlohu v regulaci tělesné teploty (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000) (Gavva et al., 2007), není však nezbytný pro vnímání bolestivých teplot. Ukázalo se rovněž, že schopnost být aktivován změnami teploty mají i někteří další členové TRP skupiny iontových kanálů, přičemž jednotlivé receptory jsou aktivovány s různým teplotním prahem (viz pro přehled (Nilius, 2007)). Zatímco TRPV2, TRPV3 a TRPV4 jsou aktivované zvýšením okolní teploty, TRPA1 a TRPM8 kanály jsou aktivovány chladem (< 20 °C). Byla vyslovena domněnka, že se termosenzitivní TRP receptory podílejí na vnímání a regulaci tělesné teploty u savců (člověka), přičemž prahová teplota pro vznik impulzní aktivity je určována mírou jejich exprese (McKemy et al., 2002) (Caterina, 2007).

Neobvykle vysoká teplotní citlivost TRPV1 kanálu charakterizovaná teplotním koeficientem $Q_{10} > 25$ (Q_{10} = poměrné zvýšení proudové odpovědi při zvýšení teploty podnětu o 10°C) je odrazem významných konformačních změn zahrnujících zřejmě alosterickou interakci podjednotek proteinového komplexu (Vyklícky et al., 1999). Vazba ligandu na receptor snižuje jeho aktivační energii natolik, že se uvedený mechanismus teplotní aktivace již neuplatňuje, což se projeví na více než desetinásobném snížení teplotního koeficientu $Q_{10} \sim 2$ (Matta and Ahern, 2007). Teplotní práh TRPV1 receptoru je zřejmě regulován distální částí jeho karboxylového konce (Prescott and Julius, 2003; Vlachova et al., 2003) a může být také nevratně snížen vlivem částečné denaturace, je-li protein vystaven teplotám přesahujícím 53°C (Lyfenko et al., 2002).

2.5.2.2 Aktivace TRPV1 receptoru depolarizací membránového potenciálu

Charakteristickou vlastností TRPV1 kanálu (ale také řady dalších TRP iontových kanálů) je jeho schopnost být aktivován změnami membránového napětí bez přítomnosti jakýchkoliv agonistů (Chuang et al., 2001) (Vlachova et al., 2002b). Vztah závislosti membránových proudů na měnícím se membránovém potenciálu vyjadřuje

křivka s výrazným usměrněním membránových proudů na pozitivních potenciálech, která je způsobena tokem kladných iontů ven z buňky (*outward rectification*) a reverzním potenciálem blízkým 0 mV. Tato vlastnost vaniloidního receptoru byla studována v nativních podmínkách u DRG neuronů (Piper et al., 1999) i na expresním systému TRPV1 receptoru (Gunthorpe et al., 2000). Bylo prokázáno, že nižší vodivost na záporných potenciálech, na rozdíl od některých jiných typů neselektivních iontových kanálů (např. NMDA), nevzniká v důsledku blokády iontového kanálu kladnými ionty např. extracelulárního baria, vápníku nebo hořčiku (Gunthorpe et al., 2000). Membránové proudy vyvolané změnami membránového potenciálu jsou v přítomnosti agonisty zvýšeny na pozitivních i negativních potenciálech (Brauchi et al., 2004; Nilius et al., 2005). Na velikost membránových proudů vyvolaných depolarizací mají rozhodující podíl typ agonisty, jeho koncentrace a fosforylovaný stav TRPV1 kanálu. Vzájemné působení agonistů a membránového napětí se zvyšuje při zánětu, kdy je pravděpodobně kanál fosforylován (Ahern and Premkumar, 2002).

TRPV1 kanály jsou strukturálně podobné napětově aktivovaným draslíkovým kanálům, jež mají senzor pro napětí lokalizován v oblasti čtvrté transmembránové domény, tedy strukturálně oddělen od póru. Napětová citlivost této domény je zřejmě dána přítomností pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků (argininu) (Sands et al., 2005). Podobný napětový senzor byl hledán i v transmembránových doménách TRP kanálů. Tyto domény však obsahují daleko méně pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků, což je zřejmě příčinou slabší napětové závislosti (Pingle et al., 2007). Podle nejnovějších studií zabývajících se strukturálními místy důležitými pro teplotní a napětovou citlivost TRPV1 kanálu se zdá být pravděpodobné, že existují molekulární senzory, které jsou odlišné pro teplotu a membránové napětí (Latorre et al., 2007; Matta and Ahern, 2007).

2.6 Mechanizmy inhibice TRPV1 receptoru

Skutečnost, že vaniloidní receptor TRPV1 hraje významnou fyziologickou úlohu v zánětlivých bolestivých onemocněních, především v tepelné hyperalgezií (Caterina et al., 2000) (Davis et al., 2000), vedla k zintenzivnění výzkumu zaměřeného na

vyhledávání látek, které by mohly selektivně blokovat aktivitu tohoto receptoru a být tak potenciálními analgetiky. Inhibitory TRPV1 receptoru lze rozdělit podle mechanismu účinku na kompetitivní, které se vážou na stejné místo jako kapsaicin nebo reziniferatoxin, a nekompetitivní, které působí prostřednictvím jiného interakčního místa. Z hlediska možného klinického využití inhibitorů TRPV1 receptoru je z důvodu předpokládané vysoké specifčnosti zaměřena pozornost především na skupinu kompetitivních inhibitorů.

2.6.1 Kompetitivní inhibitory

Jediným známým kompetitivním antagonistou TRPV1 receptoru byl po dlouhou dobu kapsazepin, první syntetický analog kapsaicinu, u něhož byly inhibiční účinky prokázány na membránových prouděch vyvolaných vaniloidy na DRG neuronech (Bevan et al., 1992). Na zvířecích modelech zánětlivé a neuropatické bolesti bylo prokázáno, že kapsazepin tlumí hyperalgezií vyvolanou mechanickými a tepelnými podněty u morčat, přičemž překvapivě nemá tyto účinky u potkanů či myší. Tyto rozdíly mezi živočišnými druhy pozorované „in vivo“ korelují s již dříve pozorovanými výsledky „in vitro“ (Walker et al., 2003). Později bylo zjištěno, že kapsazepin inhibuje také napětově závislé vápníkové kanály a acetylcholinové receptory (Docherty et al., 1997; Liu and Simon, 1997), což poněkud oslabilo představy o specifčnosti a využitelnosti tohoto antagonisty. Pomocí prostředků kombinatorické chemie a vyhledáváním v databázích organických sloučenin proto stále pokračuje hledání nových účinných kompetitivních antagonistů TRPV1 receptoru strukturálně příbuzných kapsaicinu.

Vysoce účinným kompetitivním inhibitorem TRPV1 receptoru může být iodo-reziniferatoxin (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxy RTX), látka, která ve svých obou formách (radioaktivní - ^{125}I -RTX i neradioaktivní I-RTX) silně tlumí (až čtyřicetkrát účinněji než kapsazepin) membránové proudy vyvolané vaniloidy, sníženým pH a teplem (Wahl et al., 2001). Vysokou afinitu k TRPV1 receptoru prokazuje tato látka u různých živočišných druhů savců (Rigoni et al., 2003). Podobně jako agonisté reziniferatoxin a kapsaicin, I-RTX při systémovém podání působí hypotermii a vykazuje částečně aktivační účinky (Shimizu et al., 2005).

Látky syntetizované na bázi thiomocoviny

Inhibičními účinky na membránové proudy vyvolané kapsaicinem, nízkým pH a teplem působí syntetické močoviny SB-452533 (Rami et al., 2004) a SB-705498 (Lee et al., 2003; Rami et al., 2006; Gunthorpe et al., 2007) (Lee et al., 2004). Z hlediska chemické struktury lze do této skupiny také zařadit kapsazepin (konformačně omezený analog kapsaicinu na bázi thiomocoviny). Silné inhibiční účinky ve srovnání s kapsazepinem (dvacetpětkrát až šedesátkrát) mají syntetické thiomocoviny KJM429 (N-(4-tert-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea) a JYL1421 (N-(4-tert-butylbenzyl)-N'-[3-fluoro-4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea). KJM429 zcela tlumí odpovědi vyvolané kapsaicinem, reziniferatoxinem, sníženým pH i teplem oproti JYL1421, který naopak působí jako agonista při $\text{pH} \leq 5,5$ (Wang et al., 2002). Vlastnosti působit zčásti jako agonista a zčásti jako antagonist a byly prokázány i u dalších látek JYL1511 (N-(4-tert-butylbenzyl)-N'-[3-methoxy-4-(methylsulfonylamino)benzyl]thio-urea) a JYL827 (N-[2-(3,4-dimethylbenzyl)-3-(pivaloyloxy)propyl]-N'-[4-(methylsulfonyl-amin o)benzyl]thiourea) (Wang et al., 2003). Pětikrát silnějším antagonistou než kapsazepin je IBTU (N-(4-chlorobenzyl)-N'-(4-hydroxy-3-iodo-5-methoxybenzyl)thiourea), který tlumí účinky reziniferatoxinu mnohem slaběji než kapsaicinu. V podmínkách nepřítomnosti extracelulárního vápníku se jeho inhibiční účinek vůbec neprojevuje na rozdíl od opačného účinku jiného blokátoru, iodo-reziniferatoxinu (Toth et al., 2004).

Vysoce selektivním inhibítorem TRPV1 receptoru je A-425619 (1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea), látka, která je až padesátkrát účinnější než kapsazepin a tlumí aktivaci receptoru vyvolanou jak aktivátory chemickými tak i teplem (El Kouhen et al., 2005). Podrobné studie prokázaly, že tato látka zmírňuje akutní a chronickou zánětlivou a pooperační bolest (Honore et al., 2005).

Na TRPV1 receptorech v centrální nervové soustavě (CNS) byly studovány účinky dvou antagonistů s odlišnou schopností průniku v CNS: A-784168 (1-[3-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-N-[4-(trifluoromethylsulfonyl)phenyl]-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine-4-carboxamide), látky která dobře prostupuje do nervové tkáně, a A-795614 (N-1H-indazol-4-yl-N'-[(1R)-5-piperidin-1-yl-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl]urea), látky se slabší prostupností, jež patří mezi antagonisty odvozené od thiomocoviny. Tato studie prokázala, že oba antagonisté účinně inhibují centrální

TRPV1 receptory na zvířecích modelech, přičemž míra jejich účinnosti a penetrace do nervové tkáně pozitivně koreluje. Toto zjištění podpořilo názor, že TRPV1 receptory uložené v centrální nervové soustavě mohou hrát významnou úlohu v procesu vnímání různých bolestivých podnětů (Abolish et al., 2006).

Látky syntetizované na bázi amidů

Látka SB-366791 (N-(3-methoxyphenyl)-4-chlorocinnamide) je oproti kapsazepinu vysoce selektivní a účinně tlumí aktivitu TRPV1 receptoru vyvolanou kapsaicinem, sníženým pH i teplem (Gunthorpe et al., 2004). Sloučenina 9 (AMG 9810) je další látkou, která blokuje membránové proudy vyvolané jak chemickými, tak fyzikálními aktivátory a účinně zabraňuje hyperalgezi (Gavva et al., 2005). Skupina těchto inhibitorů byla dále rozšířena o sloučeniny 49a a 49b (Doherty et al., 2005) a sloučeninu 46ad (2-piperazin-1-yl-1H-benzimidazoles) (Ognyanov et al., 2006), které prokazovaly tlumivé účinky v teplotní hyperalgezi u potkanů. Konformační změnou trans formy sloučeniny AMG 9810 [(E)-3-(4-*t*-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)acrylamide] byla syntetizována řada izosterických náhrad, z nichž nejúčinnější byly sloučeniny v *s-cis* formě, které blokují jak potkaní tak i lidské TRPV1 receptory. Pyrimidin 74 účinně blokuje hypotermický účinek vyvolaný aplikací kapsaicinu na potkaním modelu (Norman et al., 2007).

Prostřednictvím metody calcium imaging (metody, která dovoluje měřit časový průběh změn intracelulární koncentrace Ca^{2+}) byly na CHO buňkách (Chinese hamster ovary cells) studovány deriváty thiazolu (Xi et al., 2005) a řada 4-oxopyrimidinů, z nichž nejúčinnější sloučenina 23 (AMG 517) byla studována na zvířecím modelu bolesti (hlodavci) v průběhu zánětu a byla vybrána pro lidské klinické testy (Doherty et al., 2007). Srovnatelnou se sloučeninou 23 se zdá být i sloučenina 16p (AMG 628), která je považována za druhou generaci antagonistů s potenciálem klinického využití především při léčbě chronické bolesti (Wang et al., 2007). Na základě studia inhibičních účinků látky BCTC (N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide) u zvířecích modelů byla prokázána úloha TRPV1 receptoru při chronických bolestech při zánětu nebo v místě poraněné nervové tkáně (Pomonis et al., 2003).

2.6.2 Nekompetitivní inhibitory

Jako blokátor všech TRP iontových kanálů je používána rutheniová červeň (Dray et al., 1990), jejíž účinky jsou však značně nespecifické, zpravidla jen částečně vratné a mechanismus působení není přesně vymezen (Szallasi and Blumberg, 1999). Přirozeně se vyskytující specifickým antagonistou TRPV1 receptoru je thapsigargin, látka izolovaná z rostliny *Tapsia garganica* a užívaná v tradiční medicíně Evropanů a Arabů k léčení revmatické bolesti. Ve velmi nízkých koncentracích (nM) thapsigargin tlumí činnost ATPázy, která se podílí na transportu vápníku do sarkoplazmatického retikula, což se projeví přechodným zvýšením volného vápníku uvnitř buňky (Toth et al., 2002). Inhibiční účinky mají také přírodní toxiny z pavouka *Agelenopsis aperta*. Jde o polyaminy AG489 a AG505, které blokují pór vaniloidního iontového kanálu z extracelulární strany (Kitaguchi and Swartz, 2005). Nekompetitivními inhibitory se slibným antinociceptivním účinkem jsou peptidy tvořené šesti pozitivně nabitými aminokyselinami (přírodní neuropeptid dynorfin A) a od nich odvozené netoxické a metabolicky stabilní peptoidy, které s vysokou afinitou ($< 1 \mu\text{mol l}^{-1}$) blokují TRPV1 iontový kanál napěťově závislým způsobem (Planells-Cases et al., 2000) (Garcia-Martinez et al., 2002).

Mezi testovanými analgetiky prokazuje inhibiční účinek adenosin, jehož zvýšená koncentrace se vyskytuje v oblastech nadměrné neuronální aktivity v periferním nervovém systému a v míše. Tato látka interaguje s vaniloidním receptorem přímo a alostericky jej moduluje (Puntambekar et al., 2004). Jako specifický typ nekompetitivního inhibitoru TRPV1 receptoru můžeme označit i komplex mědi s fenantrolinem (Cu(II)-phenantrolin), který představuje velkou, silně pozitivně nabitou molekulu, jež napěťově závislým způsobem a s vysokou afinitou reverzibilně blokuje TRPV1 iontový kanál v otevřeném stavu (Tousova et al., 2004).

2.7 Modulace TRPV1 receptoru

2.7.1 Mechanizmy senzitivace a fosforylace: PKC, PKA, CaMKII

Vaniloidní receptor TRPV1 může být aktivován již při pokojové teplotě (25°C) v přítomnosti mediátorů zánětu uvolňujících se v oblastech poškozené nebo zanícené tkáně (prostaglandinu PGE₂, bradykininu, serotoninu 5-HT, adenosintrifosfátu nebo histaminu), neurotrofických faktorů (např. NGF) a neuropeptidů (substance P, CGRP). Tyto mediátory aktivují specifické metabotropní receptory, které jsou spřáhány s heterotrimerními G proteiny různého typu (G_s, G_q, G_i). Jejich aktivací jsou spuštěny signalizační kaskády, které vedou k fosforylaci cílového receptoru prostřednictvím různých proteinkináz. Například proces senzitivace/desenzitivace TRPV1 receptoru může být přímým důsledkem fosforylace/defosforylace proteinkinázou A, která je aktivována prostřednictvím prostanoidních receptorů EP₂ spojených s G_s proteiny. Je zřejmé, že G proteiny vykazují určitou specifitu nejen k receptorům, ale také k efektorovým proteinům. Každý metabotropní receptor váže jeden typ G proteinu, který však může aktivovat více typů efektorových proteinů. Důsledkem této skutečnosti je, že aktivace různých signálních molekul vede k ovlivnění mnoha receptorů (často i sebe sama) a naopak, aktivace různých specifických receptorů spouští stejné signální kaskády (Vlachova et al., 2002a).

Aktivita TRPV1 receptoru může být ovlivněna fosforylací kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinázou II (CaMKII), proteinkinázou C (PKC), cAMP-dependentní proteinkinázou A (PKA), nebo tyrozinkinázou Src. Samotná fosforylace proteinu většinou nezpůsobí otevření iontového kanálu, ale alostericky moduluje jeho citlivost ke specifickým aktivátorům, zpravidla tím, že snižuje práh pro jeho aktivaci. Strukturálně funkční studie v posledních letech charakterizovaly specifická fosforylační místa TRPV1 receptoru pro jednotlivé proteinkinázy (obr. 4), ale stanovit jejich úlohu *in vivo* je obtížné. Mezi hlavní PKA fosforylační místa TRPV1 receptoru patří seriny na pozicích 502 (S502) a 116 (S116) (Rathee et al., 2002) (Bhave et al., 2002), threonin 144 (T144), threonin 370 (T370), serin 774 (S774) a serin 820 (S820) (Mohapatra et al., 2003). Citlivost receptoru je ovlivňována různými izoformami PKC: PKC α (Olah et al., 2002), PKC ϵ (Premkumar and Ahern, 2000) (Numazaki et al., 2002) a PKC μ (Wang et

al., 2004b). TRPV1 receptor obsahuje 16 potenciálních fosforylačních míst pro PKC, z nichž za funkčně významné jsou považovány tři aminokyselinové zbytky: serin 800 (S800), serin 502 (S502) (Numazaki et al., 2002) (Premkumar et al., 2004) a threonin 704 (T704) (Bhave et al., 2003). TRPV1 receptor ztrácí svou afinitu k vaniloidním ligandům, jestliže není fosforylováno alespoň jedno ze dvou konzervovaných fosforylačních míst kalmodulin-závislou proteinkinázou CaMK II: serin 502 na intracelulární kličce mezi 2. a 3. transmembránovým segmentem a threonin 704 v proximální části karboxylového konce (Jung et al., 2004). Zdá se, že fosforylace různé kinázy řídí aktivitu TRPV1 receptoru dynamickou rovnováhou mezi fosforylací a defosforylací. Tyto mechanismy se pravděpodobně odehrávají hlavně prostřednictvím serinu 502, který je fosforylován třemi různými proteinkinázami.

Kromě mechanismů farmakologické senzitivace/desenzitivace je aktivita TRPV1 receptoru dlouhodobě regulována řadou dalších mechanismů především těch, které ovlivňují počet funkčních kanálů v membránách nociceptivních neuronů. Za významný regulátor aktivity TRPV1 je považován nervový růstový faktor (NGF), který zvyšuje expresi receptorů na povrchu buněk prostřednictvím MAPK (p-38 mitogen activated protein kinase) a působením Src kinázy, jejíž prostřednictvím je fosforylován tyrozin Y200 (Zhang et al., 2005).

2.7.2 Modulace membránovým lipidem PIP₂

Aktivace metabotropních receptorů (např. bradykininový receptor B2, TrkA receptor pro nervový růstový faktor) může prostřednictvím signálních kaskád vést k aktivaci fosfolipázy C (PLC) s následnou hydrolýzou membránového fosfolipidu fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu (PIP₂). PIP₂ prostřednictvím charakteristické domény TRP receptorů nacházející se v proximální části karboxylového konce, tzv. TRP boxu, stimuluje aktivitu některých z TRP kanálů: TRPV5, TRPM5, TRPM8 (Rohacs et al., 2005) a TRPM7 (Runnels et al., 2002). O působení PIP₂ na TRPV1 receptor zatím existují dvě odlišné hypotézy. Bylo prokázáno, že PIP₂ tonicky snižuje aktivitu TRPV1 kanálu přičemž hydrolýza PIP₂, která je výsledkem aktivace metabotropních receptorů a následné aktivace PLC, uvolňuje receptor z konstitutivní inhibice a vede k senzitivaci TRPV1 (Chuang et al., 2001) (Prescott and Julius, 2003). Tento inhibiční mechanismus se ovšem uplatňuje jen při nízkých koncentracích agonisty a je zřejmě nepřímý, neboť

není pozorován ve vytržených membránových terčích (Stein et al., 2006). Inhibice PLC specifickým inhibitorem U73122, dialýza PIP₂ nebo prekurzorem PIP naproti tomu snižuje desenzitizaci TRPV1 receptoru závislou na Ca²⁺ a PIP₂ může aktivovat TRPV1 receptor i nezávisle na buněčném kontextu (Lukacs et al., 2007).

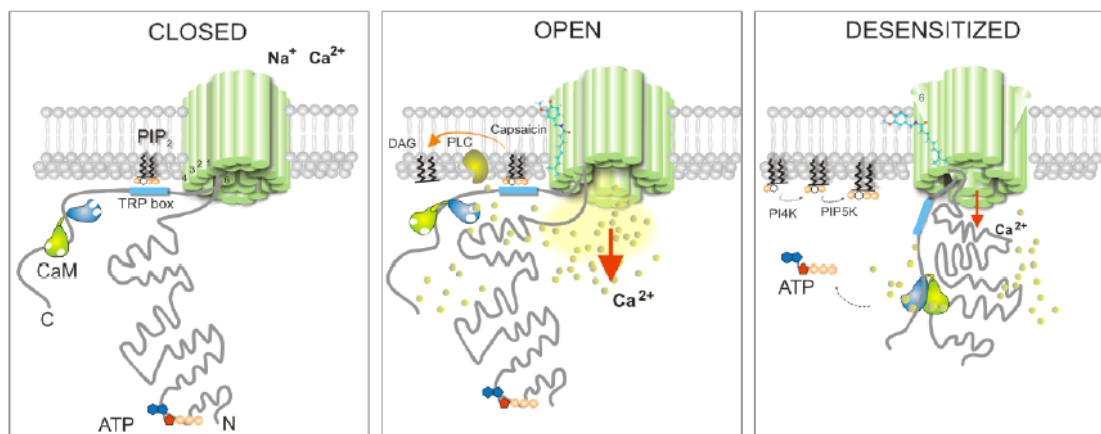
2.7.3 Možné mechanismy vzniku desenzitizace TRPV1 receptoru

Jedním z velmi důležitých poznatků na cestě k objasnění mechanismů desenzitizace TRPV1 a úlohy intracelulárního vápníku v tomto procesu se v nedávné době stal popis krystalové struktury ankyrinové části cytoplazmatického N-konce TRPV1 receptoru. Na základě vazebných a funkčních studií bylo v oblasti ankyrinových domén 1-2 identifikováno vazebné místo pro ATP (senzitivizující účinek), na něž se kompetitivním způsobem váže komplex vápník-CaM (inhibiční účinek) (Lishko et al., 2007).

K antinociceptivnímu působení kapsaicinu dochází zejména vlivem specifické aktivace vaniloidních receptorů, jež vede k řadě buněčných procesů, především ke vstupu vápníku kationtovými TRPV1 kanály do buňky. Zvýšená koncentrace intracelulárního vápníku ovlivňuje funkci dalších receptorů a enzymů, vede mj. k desenzitizaci samotného vaniloidního receptoru a může mít neurotoxické až apoptotické účinky. V současné době jsou ověřovány tři hypotézy o buněčných mechanismech, jež mohou být příčinou analgetických účinků topické aplikace kapsaicinu.

Mezi nejlépe prostudované mechanismy, o jejichž souvislosti s desenzitizací TRPV1 receptoru není pochyb, patří procesy fosforylace/defosforylace zprostředkované proteinkinázami A, C, Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkinázou II a fosfatázami, z nichž asi nejvýznamnější je kalcineurin (fosfatáza 2B) (Docherty et al., 1996). Metodami molekulární biologie se podařilo identifikovat řadu kritických fosforylačních míst, jež se uplatňují v alosterické modulaci TRPV1 receptoru (obr. 4) a mohou být příčinou snížené citlivosti nociceptorů při opakované nebo dlouhodobé aplikaci kapsaicinu (Koplas et al., 1997) (Mandadi et al., 2006) (Tominaga and Tominaga, 2005). Druhá hypotéza vysvětlující vznik desenzitizace (obr. 6) na molekulární úrovni vychází ze současných poznatků o strukturální interakci TRPV1 receptoru s jinými intracelulárními proteiny, především kalmodulinem (CaM) (Numazaki et al., 2003)

(Rosenbaum et al., 2004), který hraje významnou roli v metabolismu intracelulárního Ca^{2+} . Třetí hypotéza vzniku akutní desenzitizace vaniloidního TRPV1 receptoru předpokládá, že dochází ke změnám v interakci karboxylového konce kanálu s lipidy plazmatické membrány. Tato hypotéza se opírá o experimentální důkaz, že návrat iontového kanálu z desenzitizovaného do původního (aktivovatelného) stavu je spojen s resyntézou membránového lipidu fostatidylozitolu-4,5-bisfosfátu (PIP_2), jenž je v důsledku průniku vápníku do buňky hydrolyzován (Liu et al., 2005).



Obrázek 6. Model mechanismu desenzitizace vaniloidního receptoru TRPV1: vápenaté ionty se po průchodu pórem otevřeného iontového kanálu vážou na kalmodulin (CaM) a komplex CaM-Ca^{2+} kompetuje o vazebné místo pro adenosin trifosfát (ATP). Konformační změna způsobená vazbou CaM-Ca^{2+} na N-konec receptoru oslabí interakci proximální části C-konce s membránovým lipidem PIP_2 , což vede ke snížení afinity receptoru pro vaniloidy (Lishko et al., 2007; Novakova-Tousova et al., 2007).

Uvedené hypotézy o mechanismech vzniku akutní desenzitizace nociceptorů jsou v současné době studovány na molekulární úrovni, převážně technikami elektrofyziologického snímání aktivity rekombinantních TRPV1 receptorů v kombinaci se studiem dynamických změn intracelulární koncentrace vápníku a metodami molekulární biologie, jež umožňují zjistit význam jednotlivých aminokyselinových zbytků pro funkci proteinového komplexu iontového kanálu. Ukazuje se, že existují složité zpětnovazební mechanismy, jež se uplatňují v závislosti na množství vápníku proniknuvšího póry iontových kanálů a že „správná“ funkce TRPV1 receptoru může být určována jediným aminokyselinovým zbytkem jeho primární struktury. Získání všech nových poznatků o funkci vaniloidního receptoru by mohlo v budoucnu pomoci ve vývoji nových analgetik a při výběru klinických stavů vhodných pro tento alternativní způsob léčby (Toušová et al., 2007).

3. CÍLE PRÁCE

Předložená dizertační práce si klade za cíl přispět k objasnění některých mechanismů, jejichž prostřednictvím je aktivován a modulován vaniloidní receptor TRPV1 nocicepčními podněty. Práce uvádí nové výsledky týkající se molekulární podstaty desenzitizace TRPV1 receptoru závislé na vápníku a pokouší se uvést tyto poznatky do souvislosti se současnými představami o působení vaniloidních látek na polymodálních nociceptorech.

Dizertační práce se zabývá objasněním následujících experimentálních otázek:

1. Jaký je molekulární mechanismus, jehož prostřednictvím dochází k akutní desenzitizaci vaniloidního receptoru TRPV1? Jaká je úloha extracelulárního vápníku v tomto procesu a k jakým konformačním změnám proteinového komplexu TRPV1 dochází v přítomnosti kapsaicinu? Jaký význam mohou mít poznatky týkající se akutní desenzitizace?
2. Je aktivita vaniloidního receptoru ovlivněna v oxidačním či redukčním prostředí? Jakým molekulárním mechanismem působí redox-aktivní látky na aktivitu vaniloidního receptoru? Jaký fyziologický význam může mít tento typ modulace v nocicepci?
3. Lze předpokládat, že je aktivita TRPV1 receptoru ovlivněna blokátorem iontových kanálů gadolнием (Gd^{3+}) podobně, jako je tomu u některých příbuzných mechanosenzitivních TRP iontových kanálů? Pokud ano, jaký je mechanismus působení Gd^{3+} na tento receptor?

4. MATERIÁL A METODY

Tkáňové kultury a transfekce

V této dizertační práci byly použity jako materiál tkáňové kultury lidských embryonálních ledvinných buněk 293T (HEK 293T) případně v některých pokusech také neurony zadních kořenů míšních (DRG neurony). HEK 293T byly kultivovány v mediu OPTI-MEM (Life Technologies, USA), které bylo doplněno 5% fetálním hovězím sérem, na miskách pokrytých poly-L-lyzinem s hustotou přibližně 180 000 buněk/cm².

HEK 293T buňky byly přechodně transfekovány rekombinantní cDNA potkaního vaniloidního receptoru (rTRPV1) ve vektoru pcDNA3 v koncentraci zhruba 300-400 ng na misku, který sloužil jako *wild type* ve všech pokusech a dále byl použit Lipofectamin 2000. Proto, aby mohly být pozitivně transfekované buňky identifikovány při elektrofyziologických měřeních, byly současně transfekovány zeleným fluorescenčním proteinem neseným ve vektoru pQBI 25, a to v koncentraci 400 ng/misku. Transfekované buňky byly rozmístěny na sklíčka pokrytá poly-L-lyzinem (tři sklíčka o průměru 12 mm na jedné misce o průměru 35 mm). Kromě uvedeného TRPV1 receptoru byly studovány i jiné TRP receptory: lidský TRPV3 nesený vektorem pcDNA5/FRT, TRPM8 nesený IRES-EGFP vektorem. V některých studiích byly měřeny mutanty (konstrukty) TRPV1 receptoru, které byly připraveny molekulárně-biologickými technikami bodových mutací, jejichž přesný popis je uveden v konkrétních publikacích, které jsou součástí této dizertační práce a jejich seznam je uveden na konci této dizertační práce.

Elektrofyziologická technika patch clamp

Elektrické proudy z povrchu celých buněk (konfigurace *whole-cell*) byly snímány elektrofyziologickou technikou *patch clamp* obvykle 24 až 48 h po transfekci. Pro každou skupinu pokusů bylo studováno 5 až 8 pozitivních buněk na každém sklíčku z nejméně tří nezávislých transfekcí. *Whole-cell* proudy byly snímány zesilovačem Axopatch 1-D s použitím programu pCLAMP8. K měření byly použity elektrody z borosilikátového skla (o průměru 1.5 mm) naplněné intracelulárním roztokem, které

po naplnění vykazovaly odpor v rozmezí od 4 do 6 M Ω . Sériový odpor byl obvykle menší než 10 M Ω a byl kompenzován na 80%. Pro rychlou aplikaci chemických a teplotních podnětů byl použit aplikační systém umožňující přesné řízení teploty aplikovaných roztoků procházejících vždy jednou ze sedmi silikonových kapilár napojených na společné ústí vyrobené ze skleněné kapiláry, okolo které je omotán izolovaný měděný drátek (o průměru 20 μ m) ohřívající roztoky aplikované na buňky (Dittert et al., 1998) (Dittert et al., 2006). Teplota protékajících roztoků byla měřena malým termočlánkem umístěným do ústí kapiláry, které bylo vzdálené přibližně 100 μ m od buňky, na niž byly aplikovány roztoky.

Roztoky

Kontrolní extracelulární roztok obsahoval (mM): NaCl (160), KCl (2.5), CaCl₂ (1-2), MgCl₂ (2), HEPES (10), glukóza (10), pH bylo upravováno pomocí NaOH na hodnotu 7.3. Osmolarita extracelulárního byla 320 mOsm. Pro plnění elektrod byl použit intracelulární roztok, který obsahoval (mM): Cs-glukonát (125), CsCl (15), EGTA (5), HEPES (10), CaCl₂ (0.5), ATP (2), pH bylo upravováno pomocí CsOH na hodnotu 7.3. Osmolarita intracelulárního roztoku byla 290 mOsm.

Agonista TRPV1 receptoru, kapsaicin, byl připravován z 0.1 M zásobního roztoku v etanolu a skladován při teplotě -20 °C. Konečná koncentrace etanolu byla < 0.001 %. Ostatní experimentální roztoky konkrétního složení jsou přesně rozepsány v příslušných publikacích, jejichž seznam je uveden na konci dizertační práce.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Mechanizmy akutní desenzitizace TRPV1 receptoru

Desenzitizace je jednou z charakteristických vlastností ligandem aktivovaných receptorů, která se projevuje postupným snižováním odpovědi receptoru při přetrvávajícím působení agonisty. V případě iontových kanálů je tento děj důsledkem konformačních změn bílkovinných molekul receptorů tvořících komplex iontového kanálu. Akutní desenzitizace TRPV1 receptoru způsobená kapsaicinem je složitým procesem s měnícími se kinetickými komponentami, které jsou závislé na vstupu vápníku tímto iontovým kanálem do buňky.

Při studiu mechanismů akutní desenzitizace jsme si dali za cíl zodpovědět tyto otázky:

- Definovat akutní desenzitizaci TRPV1 a stanovit vliv zvýšené teploty (z 25°C na 35°C) na tento děj.
- Objasnit zda může být desenzitizace příčinou snížené afinity receptoru k jeho agonistovi.
- Objasnit, zda může být defosforylace dvou klíčových fosforylačních míst, serinu 502 a threoninu 704, prostřednictvím kalmodulin dependentní kinázy II (CaMKII) příčinou desenzitizace TRPV1 nebo spíše jejím doprovodným jevem.
- Může mít interakce membránového PIP₂ s aminokyselinami z oblasti TRP boxu TRPV1 vliv na desenzitizaci TRPV1 a pokud ano, do jaké míry se na tom podílí arginin 701 ležící v blízkosti klíčového threoninu 704?

5.1.1 Vliv teploty na rychlost akutní desenzitizace závislé na vápníku

Při akutní desenzitizaci TRPV1 kanálu dochází v přítomnosti extracelulárního vápníku k rychlému snížení membránových proudů během první aplikace kapsaicinu.

Molekulární podstata tohoto děje není dosud plně objasněna a kinetické parametry, které jej popisují, jsou v literatuře často velmi odlišné.

V naší studii jsme se proto nejdříve zaměřili na charakterizaci časového průběhu membránových proudů během definovaného intervalu 20 sekund první aplikace 1 μM kapsaicinu. HEK 293T buňky transfekované TRPV1 kanálem byly stimulovány v přítomnosti 2 mM vápníku dvěma po sobě jdoucími aplikacemi 1 μM kapsaicinu, přičemž doba působení a interval mezi jednotlivými aplikacemi byl vždy 20 s. Z každého experimentálního sklíčka obsahujícího velké množství buněk, které je možno měřit, byla použita vždy jen jedna buňka a poté bylo sklíčko vyměněno, abychom si byli jisti, že záznamy jsou pořízeny z buněk, které nebyly ovlivněny žádnou předchozí aplikací kapsaicinu. Měřili jsme kinetické parametry prvních odpovědí na kapsaicin při dvou různých teplotách. Při pokojové teplotě (25 °C) byla průměrná rychlost aktivace receptorů a amplituda odpovědi nižší než při teplotě 35 °C. Takovou závislost lze na základě termodynamických zákonů očekávat a zdálo by se, že tato informace nepřináší nic nového. Podrobným zkoumáním rychlosti desenzitizace se však podařilo odlišit časové konstanty desenzitizace, které jsou při teplotě 25 °C velmi heterogenní (od 2.8 s do více než 20 s) a zvýšením teploty o 10 °C (z 25 °C na 35 °C) se natolik zrychlí, že je již možné stanovit průměrnou časovou konstantu akutní desenzitizace poměrně přesně (4.4 ± 0.5 s; $n = 10$).

5.1.2 Akutní desenzitizace snižuje afinitu vazebního místa pro kapsaicin

V porovnání s rychlým nástupem první kapsaicinové odpovědi byla časová konstanta druhé kapsaicinové odpovědi snímané o 20 s později o řád pomalejší ($\tau_{\text{on}} = 3.6$ s vs. 0.5 s). Tuto změnu v nástupu aktivace lze vysvětlit sníženou afinitou desenzitizovaného receptoru ke kapsaicinu. Takový mechanismus je v souladu s předchozími publikovanými nálezy, že reziniferatoxin ($^3\text{[H]RTX}$) se neváže k desenzitizovanému TRPV1 receptoru (Jung et al., 2004). Abychom otestovali tuto hypotézu, aplikovali jsme kapsaicin ve vysoké koncentraci (30 μM), po té, co byl receptor desenzitizován první aplikací 1 μM kapsaicinu. To mělo za následek okamžité a plné obnovení maximální aktivity kanálu s nižším stupněm akutní desenzitizace než ten, který jsme pozorovali při aplikaci 1 μM kapsaicinu. Položili jsme si proto otázku, zda mechanismus, který zodpovídá za vznik akutní desenzitizace, může souviset

s počtem receptorových podjednotek vytvářejících iontový kanál. Dá se předpokládat, že v případě kapsaicinu stačí k maximální aktivaci kanálu navázání dvou molekul agonisty na dvě podjednotky kanálu (Hillův koeficient je ~ 2), kdežto v případě piperinu, jiného agonisty TRPV1 s vyšším stupněm kooperativity (Hillův koeficient je ~ 4), je k aktivaci kanálu zapotřebí navázání maximálního počtu 4 molekul agonisty tak, aby byla všechna čtyři receptorová místa kanálu obsazena (McNamara et al., 2005). Podobně jako v případě kapsaicinu jsme zjistili, že kanál desenzitizovaný piperinem ($30 \mu\text{M}$) byl schopen dosáhnout maximální míry aktivace při aplikaci vysoké koncentrace piperinu ($100 \mu\text{M}$).

Z dříve publikovaných studií je známo, že k desenzitizaci TRPV1 kanálu nedochází při aplikaci agonisty v roztoku bez vápníku a že takto aktivované kanály se deaktivují s velmi pomalou časovou konstantou (Docherty et al., 1996; Koplas et al., 1997; Mohapatra et al., 2003). Vysvětlujeme to tím, že kanál setrvává relativně dlouho v některém z otevřených stavů a méně často se uzavírá, což může být také odrazem jeho vysoké afinity pro agonistu. V našich pokusech jsme se přesvědčili o tom, že se nedesenzitizované kanály v kontrolním roztoku bez vápníku skutečně velice dlouho deaktivují ($T_{50} = 7.4 \pm 1.0 \text{ s}$) oproti kanálům, které byly předtím desenzitizovány aplikací kapsaicinu v roztoku s vápníkem ($T_{50} = 2.0 \pm 0.4 \text{ s}$; $n = 11$).

Výše uvedená data naznačují, že akutní desenzitizace TRPV1 kanálu souvisí s dynamikou vstupu vápenatých iontů do buňky a vedou k jeho uzavření a naopak bezprostředně po odstranění vápníku z roztoku, se desenzitizované kanály rychleji reaktivují. Dále přinášíme tři důkazy o tom, že desenzitizace TRPV1 kanálu může být funkčním odrazem snížené afinity kanálu k ligandu. Zaprvé, desenzitizované kanály jsou aktivovány s daleko pomalejší rychlostní konstantou než nedesenzitizované kanály. Jinými slovy: rychlost nástupu aktivace (otevírání) je u desenzitizovaných kanálů daleko nižší než u nedesenzitizovaných kanálů. Zadruhé, po ukončení aplikace kapsaicinu se desenzitizované kanály uzavírají daleko rychleji než nedesenzitizované kanály, neboli rychlost deaktivace (uzavírání) je u desenzitizovaných kanálů daleko vyšší (zhruba 4x) než u nedesenzitizovaných kanálů. Zatřetí, skoro úplná desenzitizace může být do určité míry překonána vysokými koncentracemi agonisty. Tato poslední zmíněná vlastnost TRPV1 kanálu jej zásadně odlišuje od většiny jiných známých iontových kanálů, jakými jsou P2X, NMDA, AMPA, GABA_A, ACh nebo ASIC, u

kterých vede vysoká koncentrace ligandu vždy k vyššímu stupni desenzitizace (Kardos and Nyikos, 2001; Dilger, 2002).

5.1.3 Defosforylace S502 a T704 není příčinou akutní desenzitizace

Snížená schopnost TRPV1 receptoru vázat vaniloidy byla dříve studována jako jedna z možných příčin desenzitizace TRPV1 receptoru a tento proces byl spojován se současnou defosforylací dvou fosforylačních míst pro CaMKII (Jung et al., 2004). Nebylo však jasné, zda je defosforylace příčinou desenzitizace, nebo spíše doprovodným jevem aktivace receptoru. Proto jsme se touto problematikou zabývali hlouběji. Metodou bodových mutací jsme připravili dva dvojnásobné mutanty potkaního TRPV1 receptoru, ve kterých byly zaměněny aminokyseliny, které jsou prokázány fosforylačními místy pro CaMKII, serin v pozici 502 (S502) a threonin v pozici 704 (T704), za neutrální aminokyseliny alanin a isoleucin (S502A/T704I a S502A/T704A). Měřením membránových proudů jsme zjistili, že mutantní kanál S502A/T704I vykazuje značné změny funkce ve srovnání s wild typem: zcela ztratil citlivost na kapsaicin, ale citlivost k nízkému pH a k teplotním stimulům byla zachována. Mutantní kanál S502A/T704A zachoval citlivost ke všem aktivátorům: kapsaicinu, sníženému pH a bolestivému teplu. Tento mutant desenzitizoval podobně jako wild type. Mutanty, ve kterých byly nahrazeny buď serin 502 za alanin (S502A) nebo threonin 704 za isoleucin (T704I), vykazovaly normální odpovědi na všechny podněty jako kontrolní wild type. Z těchto výsledků vyplývá, že pro správnou funkci kanálu je nutná interakce minimálně dvou odlišných oblastí TRPV1 kanálu. Kromě toho se zdá, že threonin 704 leží v kritické oblasti receptoru, nejen pokud jde o vazbu agonisty, ale také co se týče samotného otevírání kanálu. Naše výsledky, prokazující funkčnost S502A/T704A mutantu, tak byly v rozporu s dříve publikovanou hypotézou založenou na představě, že za ztrátu schopnosti TRPV1 receptoru vázat vaniloidy je zodpovědná současná defosforylace obou fosforylačních míst (Jung et al., 2004). Navzdory jasným účinkům mutantu S502A/T704I ve vazbě vaniloidů, však není pravděpodobné, že by T704, který je součástí tzv. TRP domény, tvořil část vazebného místa (Jordt and Julius, 2002; Gavva et al., 2004; Chou et al., 2004). Naše data naznačují, že mutant T704I funkčně “rozpoznává“ specifické místo S502, nebo naopak mutant S502A rozlišuje mezi specifickými mutacemi na pozici T704.

5.1.4 Klíčová úloha argininu na pozici 701 v regulaci aktivity TRPV1

Na základě statistických analýz částí sekvencí TRPV1 kanálu, které lze fosforylovat, byl arginin na pozici 701 definován jako specificky určující faktor fosforylace threoninu 704 prostřednictvím CaMKII. Celé fosforylační místo leží na proximálním C konci tzv. TRP domény sousedící s distální částí 6. transmembránové domény TRPV1 receptoru vytvářející vnitřní část póru iontového kanálu. Tato oblast obsahuje několik konzervovaných pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků, které mohou interagovat s negativně nabitými membránovými fosfolipidy, jako je PIP₂ (Rohacs et al., 2005; Qin, 2007). V nedávné době bylo zjištěno, že aktivace TRPV1 receptoru vede k vyčerpání zásob membránového PIP₂ a pravděpodobně existuje vztah mezi stupněm desenzitizace TRPV1 receptoru a hladinou membránového PIP₂ (Liu et al., 2005). Naše data ukazují, že různé mutace threoninu na pozici 704 ovlivňují funkčnost TRPV1 kanálu, a uvažovali jsme o tom, zda strukturální změny aminokyselinových zbytků v jeho bezprostředním okolí mohou být podstatou oslabené interakce PIP₂ s TRPV1 receptorem a způsobit tak desenzitizaci kanálu. Abychom otestovali tuto možnost, připravili jsme tři mutanty (K698A, R701A a K710A), ve kterých jsme nahradili pozitivně nabitě aminokyseliny K698, R701 a K710 za neutrální aminokyselinu alanin. Tyto aminokyseliny jsou analogické vůči K995, R998 a R1008 u příbuzného TRPM8 kanálu, který prostřednictvím těchto aminokyselin interaguje s PIP₂. Mutant R701A vykazoval pozměněnou teplotní a chemickou citlivost (zpomalenou rychlost kapsaicinové disociace), ale napěťová citlivost zůstala nezměněna. Mutanty K698A a K710A byly ve své citlivosti ke kapsaicinu, nízkému pH a bolestivému teplu funkčně velmi podobné wild typu. Úloha R701 v regulaci aktivity TRPV1 receptoru je z těchto výsledků zřejmá a proto jsme chtěli zjistit, zda by se mohla uskutečňovat prostřednictvím interakcí s membránovým PIP₂. HEK 293T buňky jsme transfekovali TRPV1 kanálem společně s Kir2.1 draslíkovým kanálem, jehož aktivita závisí na přítomnosti PIP₂ v plazmatické membráně buněk (Zhang et al., 1999). Membránové proudy vyvolané 20s trvající aplikací kapsaicinu (1 a 30 μM) v kontrolním extracelulárním roztoku s 2 mM vápníkem desenzitizovaly. Pozorovali jsme výrazné snížení membránových proudů nesených Kir2.1 kanály (o ≥ 95 %), což svědčilo o vyčerpání zásob membránového PIP₂. Přibližně za 2 minuty po odmytí kapsaicinu se aktivita Kir2.1 kanálů plně obnovila (což lze vysvětlit tím, že se za tuto

dobu stačil resyntetizovat PIP₂ v buněčné membráně), avšak TRPV1 kanály zůstaly desenzitizovány. Ve shodě s předchozí publikací (Liu et al., 2005) lze říci, že aktivita TRPV1 kanálů ovlivňuje hladinu membránového PIP₂ a je tedy možné, že desenzitizace může být funkčním odrazem nedostatku PIP₂ v membráně. Naše výsledky navíc prokázaly, že obnova samotného PIP₂ v plazmatické membráně nestačí k tomu, aby byl TRPV1 kanál navrácen z desenzitizace. Vyslovili jsme hypotézu, že arginin 701, který je silně konzervován mezi příbuznými kanály tzv. TRP skupiny (TRPM, TRPC a TRPV1-3) je klíčovým aminokyselinovým zbytkem v interakcích mezi TRPV1 kanálem a membránovým PIP₂. Na základě zjištěných výsledků se domníváme, že arginin 701 může hrát důležitou úlohu v desenzitizaci TRPV1 kanálu závislé na vápníku. Zaprvé, nachází se ve vysoce konzervované TRP doméně, která je strategicky lokalizovaná blízko vchodu do póru kanálu a významně se podílí na modulaci otevírání kanálu. Zadruhé, vzhledem k tomu, že je část sekvence pro CaMKII a PKC fosforylaci v oblasti zahrnující T704, může arginin 701 regulovat procesy fosforylace a defosforylace kanálu na tomto místě. Zatřetí, oblast okolo R701 je pravděpodobně lokalizována na povrchu proximální části C-konce a postranní řetězec tohoto aminokyselinového zbytku může tedy elektrostaticky interagovat s jinou částí kanálu nebo s negativně nabitými fosfolipidy, které jsou pravděpodobně zahrnuty v desenzitizaci závislé na vápníku (tato hypotéza byla v nedávné době podpořena jinou laboratoří (Brauchi et al., 2007)). Začtvrté, mutace argininu v pozici 701 (R701A) významně ovlivňuje rychlost disociace kapsaicinu z kanálu, což naznačuje, že tento zbytek může přímo ovlivňovat vazbu agonisty na TRPV1 receptor.

FUNCTIONAL CHANGES IN THE VANILLOID RECEPTOR SUBTYPE 1 CHANNEL DURING AND AFTER ACUTE DESENSITIZATION

K. NOVAKOVA-TOUSOVA,^a L. VYKLIČKY,^a
K. SUSANKOVA,^a J. BENEDIKT,^a A. SAMAD,^{a,b}
J. TEISINGER^a AND V. VLACHOVA^{a*}

^aDepartment of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

^bLaboratory of High Performance Computing, Institute of Systems Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic and Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Zamek 136, 373 33 Nove Hrad, Czech Republic

Abstract—Agonist-induced desensitization of the transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1) is one of the key strategies that offer a way to alleviate neuropathic and inflammatory pain. This process is initiated by TRPV1 receptor activation and the subsequent entry of extracellular Ca²⁺ through the channel into sensory neurones. One of the prominent mechanisms responsible for TRPV1 desensitization is dephosphorylation of the TRPV1 protein by the Ca²⁺/calmodulin-dependent enzyme, phosphatase 2B (calcineurin). Of several consensus phosphorylation sites identified so far, the most notable are two sites for Ca²⁺/calmodulin dependent kinase II (CaMKII) at which the dynamic equilibrium between the phosphorylated and dephosphorylated states presumably regulates agonist binding. We examined the mechanisms of acute Ca²⁺-dependent desensitization using whole-cell patch-clamp techniques in human embryonic kidney (HEK) 293T cells expressing the wild type or CaMKII phosphorylation site mutants of rat TRPV1. The nonphosphorylatable mutant S502A/T704I was capsaicin-insensitive but the S502A/T704A construct was fully functional, indicating a requirement for a specific residue at position 704. A point mutation at the nearby conserved residue R701 strongly affected the heat, capsaicin and pH-evoked currents. As this residue constitutes a stringent CaMKII consensus site but is also predicted to be involved in the interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), these data suggest that in addition to dephosphorylation, or as its consequence, a short C-terminal juxtamembrane segment adjacent to the transient receptor potential box composed of R701 and T704 might be involved in the decelerated gating kinetics of the desensitized TRPV1 channel. © 2007 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: capsaicin, vanilloid receptor, TRP channels, structure-function relationship, desensitization.

The vanilloid receptor TRPV1 (transient receptor potential vanilloid receptor-1) is a nonselective cation channel that is

*Corresponding author. Tel: +420-29644-2711; fax: +420-29644-2488. E-mail address: vlachova@biomed.cas.cz (V. Vlachova).

Abbreviations: CaMKII, Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II; GFP, green fluorescent protein; HEK, human embryonic kidney; I–V, current–voltage; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; TRP, transient receptor potential; TRPV1, transient receptor potential vanilloid receptor-1.

0306-4522/07/\$30.00+0.00 © 2007 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2007.07.039

predominantly expressed by nociceptive primary sensory neurons. This channel can be activated by vanilloid compounds like capsaicin or resiniferatoxin, low pH (<6.5), noxious heat (>43 °C), phorbol esters (Premkumar and Ahern, 2000; Bhawe et al., 2003), and depolarizing voltages (see Planells-Cases et al., 2005; Tominaga and Tominaga, 2005; Szallasi et al., 2006; Pingle et al., 2007 for recent reviews). Upon activation, TRPV1 can regulate cellular Ca²⁺ levels via direct permeation (P_{Ca}/P_{Na} ~10), which concomitantly down-regulates its own activity. Among the Ca²⁺-activated enzymes that are believed to play pivotal roles in this TRPV1 acute desensitization process is the Ca²⁺/calmodulin-dependent Ser/Thr phosphatase 2B, calcineurin (Docherty et al., 1996; Mohapatra and Nau, 2005), which dephosphorylates TRPV1 receptors. Conversely, phosphorylations at several consensus sites for protein kinase C (PKC) (Numazaki et al., 2002; Bhawe et al., 2003; Mandadi et al., 2004, 2006) and cAMP-dependent protein kinase A (PKA) (Bhawe et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2003) are able to reduce the Ca²⁺-mediated desensitization of TRPV1. Thus, it seems that the desensitization of TRPV1 is mostly a functional reflection of the dynamic balance between the Ca²⁺-dependent phosphorylation and dephosphorylation of the TRPV1 protein. In addition, the processes known to accompany acute Ca²⁺-dependent TRPV1 desensitization are: 1) a profound change in voltage dependence (Piper et al., 1999; Gunthorpe et al., 2000), 2) loss of capsaicin binding (Jung et al., 2004), and 3) depletion of membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) (Liu et al., 2005). In fact, it is not presently clear which of these processes is primarily the cause of desensitization rather than consequences of TRPV1 activation.

Recently, it was reported that TRPV1 must be phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin dependent kinase II (CaMKII) at at least one of the two consensus sites, S502 and T704, before it can be activated by capsaicin (Jung et al., 2004). Since the former site is a rather non-specific target sequence for both PKC and PKA, it has become evident that T704 might play a more specific role in the regulation of capsaicin-induced activity. This residue has been identified as an *in vitro* PKC phosphorylation site, and has also been reported to be critically involved in the activation of TRPV1 by phorbol esters (Bhawe et al., 2003).

We examined the dynamics of Ca²⁺-dependent capsaicin-induced desensitization in the wild type and CaMKII phosphorylation site mutants of the rat TRPV1 channel. We identified a single conserved residue located within the transient receptor potential (TRP) box as an important regulator of TRPV1 channel activity. Since this residue not

only constitutes a stringent CaMKII consensus site, but might also be involved in TRPV1–PIP₂ interaction, we hypothesize that acute desensitization could alter the Ca²⁺-dependent allosteric coupling between the capsaicin binding site and the PIP₂-sensitive gating apparatus of the TRPV1 channel.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells (S.D. 3515; ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in OPTI-MEM I medium (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 5% FBS (fetal bovine serum). Cells were plated onto dishes coated with collagen at a density of ~180,000 cells cm⁻². 293T Cells were transiently transfected with 300–400 ng/dish of recombinant plasmid cDNA encoding wild-type or mutant rat TRPV1 (wild type in the pcDNA3.1 vector kindly provided by Dr. D. Julius, San Francisco, CA, USA) and/or mouse Kir2.1 (in pcDNA1/Amp; kindly provided by Dr. Lily Jan, University of California, San Francisco, CA, USA) using either the Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Paisley, UK) or magnet-assisted transfection method (IBA GmbH, Göttingen, Germany) according to the manufacturer's protocols. To identify the transfected cells in electrophysiological experiments, a cDNA plasmid encoding green fluorescent protein (GFP) in the pQBI 25 vector (TaKaRa, Shiga, Japan) was co-transfected at a concentration of 400 ng/dish. Transfected cells were replated onto glass coverslips (three 12 mm coverslips per 35 mm dish) coated with collagen and poly-L-lysine. Electrophysiological experiments were performed 24–48 h after transfection. The wild-type channel was regularly tested in the same batch as the mutants. When compared visually, the intensity of the GFP was similar for all of the constructs tested.

Construction of mutants of TRPV1

The rat TRPV1 mutants were constructed by PCR amplification using rat TRPV1-specific overlapping primer pairs synthesized to contain a point mutation converting the respective nucleotides to alanine. The QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used according to the manufacturer's protocol to perform point mutations in TRPV1. All PCR-generated constructs were subjected to DNA sequencing (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for potential errors generated by *Taq* polymerase.

Electrophysiology

Whole cell membrane currents were recorded by employing an Axopatch-1D amplifier and pCLAMP9 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Electrodes were pulled from borosilicate glass and had a resistance of 4–6 M Ω after filling. The series resistance was usually less than 10 M Ω and was compensated to ~80%. A system for fast superfusion of the cultured cells was used for drug application and thermal stimulation (Dittert et al., 2006). Briefly, experimental solutions were driven by gravity from seven different barrels through automatically controlled valves to a manifold that consisted of fused silica tubes connected to a common outlet glass capillary. The upper section of the outlet capillary passed the solutions through a heat exchanger connected to a miniature Peltier device that preconditioned the temperature (precooling or preheating). The lower part of the capillary was wrapped with densely coiled copper wire that heated the solution to a chosen final temperature. The temperature of the superfusing solution was measured by a miniature thermocouple inserted into the outlet capillary near to its orifice, which was placed less than 100 μ m from the cell under investigation.

Reagents and solutions

The cells were superfused with an extracellular control solution with the following composition (mM): NaCl, 160; KCl, 2.5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; Hepes, 10; glucose, 10; the pH was adjusted to 7.3 with NaOH. In the Ca²⁺-free solution, 1 mM EGTA was added to chelate residual Ca²⁺. The intracellular pipette solution (ICS) contained (mM): Cs-gluconate, 125; CsCl, 15; EGTA, 5; Hepes, 10; CaCl₂, 0.5; MgATP, 2; the pH was adjusted to 7.3 with CsOH. The osmolarities of the extracellular and intracellular solutions were 320 and 286 mOsm. Unless otherwise specified, all chemicals and reagents were purchased from the Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). Capsaicin solution was prepared from a 0.1 M stock solution in ethanol, stored at –20 °C. The final concentration of ethanol was <0.01%.

Statistical analysis

Data were routinely discarded if the leak exceeded 5% of the maximum amplitude. Current–voltage (*I*–*V*) relationships were obtained from steady state whole-cell currents measured at the end of 60-ms voltage steps from –140 to +100 mV. The heat-evoked whole cell currents sampled during the rising phase of the temperature ramp were pooled for every 0.25 °C. All data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical significance was determined by Student's *t*-test and Pearson product-moment correlation analysis using SigmaPlot 9 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Differences were considered significant at *P* < 0.05. For kinetic modeling, the current responses were normalized to the peak amplitude and fitted using Gepasi 3.3 (Mendes, 1993, 1997; Mendes and Kell, 1998).

RESULTS

Temperature dependence of acute desensitization points to one essential or predominant Ca²⁺-dependent mechanism

The desensitization of the TRPV1 receptor to capsaicin has been proposed to be a complex process with varying kinetic components, some of which depend on calcium influx through the channel. Because the most prominent Ca²⁺-dependent diminution of whole-cell responses occurs within the first few seconds after capsaicin is applied to a cell for the first time, we initially sought to kinetically describe the time course of the responses induced by a desensitizing concentration of capsaicin within the first 20 s of exposure. HEK 293T cells transiently expressing TRPV1 channels were stimulated by two sequential applications of 1 μ M capsaicin (20 s) in the presence of 2 mM extracellular Ca²⁺ using an interpulse interval of 20 s (Fig. 1). Only one recording was performed on any coverslip of cells to ensure that recordings were made from cells not previously exposed to capsaicin. At 25 °C, the TRPV1-mediated inward currents initially reached their peak of 5.6 \pm 0.6 nA 2.7 \pm 0.3 s after the beginning of activation and then declined with a half-decay time varying from 2.8 s to more than 20 s (median 7.1 s; *n* = 17). Due to the high degree of kinetic heterogeneity among capsaicin-induced currents also reported by others (Docherty et al., 1996; Koplas et al., 1997; Piper et al., 1999), the currents could not be fitted consistently with the sum of up to five exponential functions. The most frequently encountered exponential component had a tau of 0.52 \pm 0.07 s (*n* = 11) characterizing the onset of activation. We expected that some

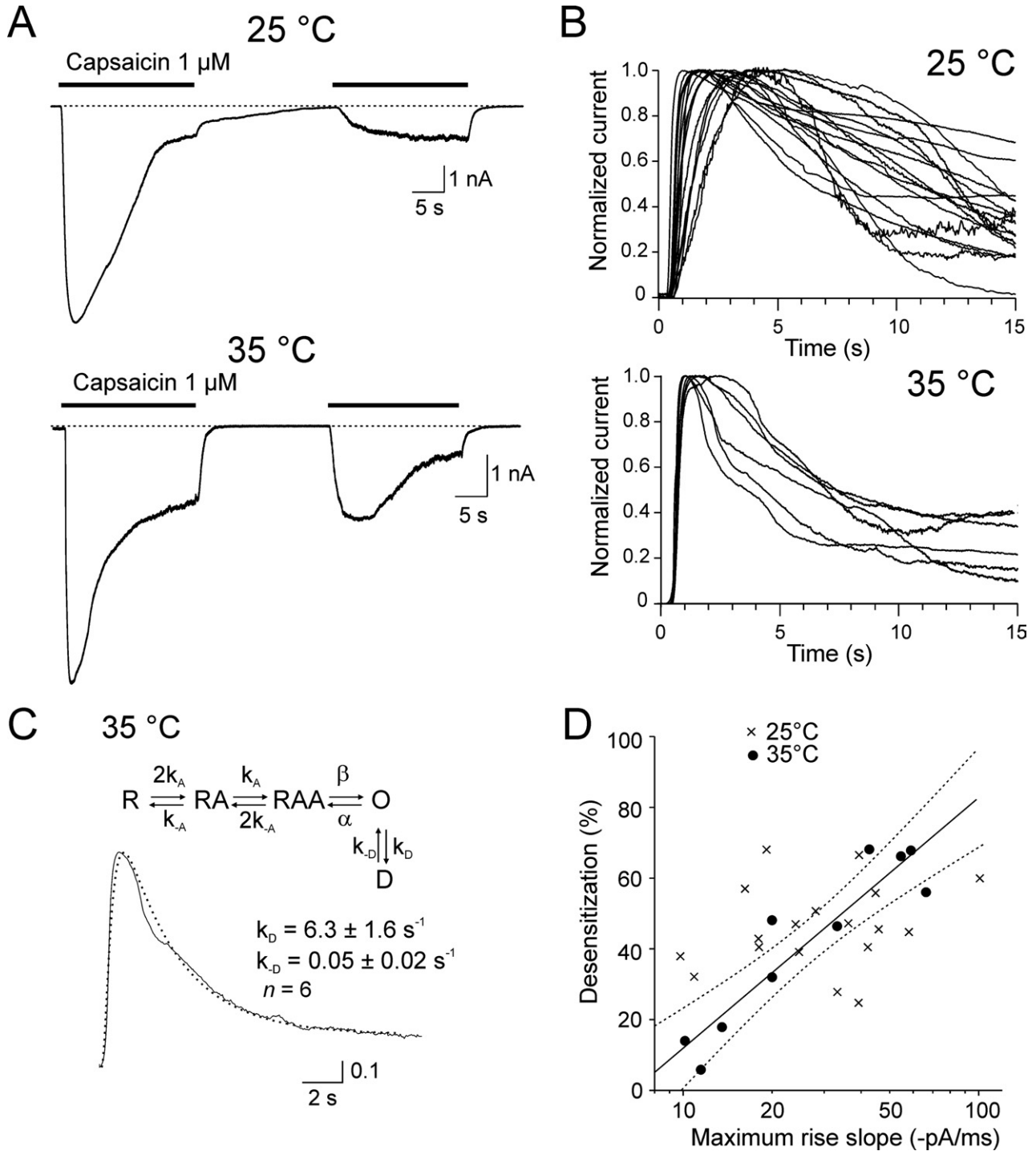


Fig. 1. Temperature dependence of acute Ca^{2+} -mediated desensitization of capsaicin-activated currents recorded from TRPV1-transfected HEK293T cells. (A) Representative whole-cell recordings illustrating the design of the experiment used to examine the effect of temperature on capsaicin-gated currents at 25 °C (upper panel) and at 35 °C (lower panel). Current responses were evoked by two sequential 20 s applications of 1 μM capsaicin in Ca^{2+} -containing (2 mM) extracellular solution. Bars indicate duration of drug application. Dashed lines indicate zero current level. Holding potential -70 mV . (B) Representative traces of responses to the first capsaicin application normalized to the peak amplitude obtained from currents evoked in experiments as described in A. (C) The normalized responses obtained at 35 °C were fitted to the kinetic scheme using Gepasi 3.3 (Mendes and Kell, 1998). The averaged estimated rate constants for capsaicin association (k_A) and dissociation (k_{-A}) were $1.9 \pm 0.6 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $2.2 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ ($n=6$). The channel opening and closing rate constants were β ($156.5 \pm 19.6 \text{ s}^{-1}$) and α ($495.3 \pm 71.2 \text{ s}^{-1}$), respectively. The forward (k_D) and backward (k_{-D}) rate constants for desensitization are indicated. (D) Correlation at 35 °C (filled circles) and a lack of correlation at 25 °C (crosses) between the maximum slope of current rise and the degree of acute desensitization assessed as the area under the current response over a time of 20 s normalized to the area under an idealized, nondesensitizing current of the same size (Mohapatra and Nau, 2003).

of the above components might be distinguished by their differing sensitivity to temperature. Indeed, when cells were exposed to 1 μM capsaicin at 35 °C, the mean half-decay time decreased to 4.4 ± 0.5 s and currents peaked 1.7 ± 0.4 s after the beginning of activation at 6.2 ± 0.9 nA ($n=10$). These currents were well fitted to a sequential kinetic model with forward and backward desensitization rate constants of 6.3 ± 1.6 s⁻¹, and 0.05 ± 0.02 s⁻¹ respectively ($n=6$; Fig. 1C), suggesting that the channels remain largely trapped in the desensitized state. At 25 °C, we found no good correlation ($r=0.26$; $n=18$, $P=0.31$) between the peak current amplitude and the degree of acute desensitization, assessed as the area under the current response over a time of 20 s normalized to the area under an idealized, nondesensitizing current of the same size (Mohapatra and Nau, 2003). On the other hand, at 35 °C there was a clear positive correlation between the maximum slope of current rise and degree of desensitization (Fig. 1D; $r=0.86$; $n=10$, $P=0.001$), indicating that the dynamics of the initial current phase is an important parameter for this process. These data also suggest that acute desensitization of the TRPV1 channel might be simply explained by a sequential model in which the current-flux (i.e. Ca²⁺-flux) through the open channel immediately leads to the closed state.

The apparent affinity for capsaicin is decreased in a desensitized TRPV1 channel

In contrast to the fast onset of the first capsaicin response recorded in a 2 mM Ca²⁺-containing bath solution, the time constant characterizing the activation of a subsequent response recorded 20 s later was slower by about one order of magnitude (Fig. 2C; $\tau_{\text{on}}=3.6 \pm 0.5$ s; $n=12$). We suspected that the change in the onset rate might have been the result of a decreased apparent affinity of desensitized TRPV1 receptors for capsaicin. Such a mechanism would be consistent with the previous finding that [³H]RTX does not specifically bind to desensitized TRPV1 (Jung et al., 2004). To test this hypothesis, we first applied a high concentration of capsaicin (30 μM) to TRPV1 channels that had been previously desensitized by 1 μM capsaicin. This immediately resulted in a fast and full restoration of maximal channel activity with a much lower degree of acute desensitization than that observed at 1 μM concentration (Fig. 2B). The channels then remained in their completely desensitized state relative to 1 μM but were still always able to respond to 30 μM capsaicin.

Consistent with several previous studies (Docherty et al., 1996; Koplas et al., 1997; Mohapatra et al., 2003), TRPV1-mediated currents decayed very little when 1 μM capsaicin was applied for the first time to a cell in the absence of Ca²⁺ (Fig. 2A). Notably, in this case, the deactivation rate was extremely slow ($T_{50}=7.4 \pm 1$ s; Fig. 2D) and the current at the offset of capsaicin application had a clearly sigmoidal shape, suggesting that the channel spends relatively more time in transitions among open states, but less time in the final closing step. In contrast, when the channels were desensitized by 1 μM capsaicin applied for 20 s in the presence of Ca²⁺, the half-decay

time of the deactivation measured in the absence of Ca²⁺ was strongly reduced (to $T_{50}=2.0 \pm 0.4$ s; $n=11$; $P<0.01$, paired *t*-test).

The TRPV1 channel can bind a maximum of four agonist molecules, but with capsaicin two molecules are likely sufficient to activate the channel (Hui et al., 2003). Piperine, another TRPV1 receptor agonist has a higher degree of cooperativity (Hill coefficient ~ 4) and a clear propensity to cause greater desensitization than capsaicin (McNamara et al., 2005). We wondered if the mechanism underlying acute desensitization is linked to a fraction of the ligand-occupied conformations of the receptor subunits. It then became important to determine whether piperine would also be able to overcome desensitization by utilizing a supersaturating concentration. As with capsaicin, piperine-activated currents at 30 μM exhibited a substantial Ca²⁺-dependent desensitization that was completely reactivated by a 100 μM concentration of piperine (Fig. 2F). These findings again suggest that the decreased responsiveness of the desensitized TRPV1 channel to capsaicin or piperine might reflect a reduced apparent affinity for the agonist. The low-affinity state seems to depend on the extracellular calcium because, upon the removal of Ca²⁺ from the extracellular medium, already-desensitized channels appear to open more readily (Fig. 2A, E).

Nonphosphorylatable double mutants S502A/T704I and S502A/T704A

The Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 leads to a reduced ligand binding ability and the same defect is seen in receptors where two putative consensus sites for CaMKII have been simultaneously replaced with nonphosphorylatable residues (Jung et al., 2004). It is not clear, however, whether Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation is primarily a cause of the desensitization or rather an accompanying process of TRPV1 activation. For the sake of comparison, we repeated the same experiments described in Jung et al., 2004 on a double mutant of TRPV1, in which the two CaMKII consensus sites, S502 and T704, were substituted with alanine and isoleucine, respectively (S502A/T704I). As described previously (Jung et al., 2004) (Fig. 3A), the mutant channel was insensitive to 1 μM capsaicin but retained its sensitivity to low pH. We found that this mutant also responded to heat stimuli, but with a shallower temperature-response profile than cells expressing the wild-type channel and with a slight anti-clockwise hysteresis in response to heating and cooling between 25 °C and 35 °C (Fig. 3D). We hypothesized that if the constitutively dephosphorylated state of the receptor mimics its desensitized conformation, then this desensitization might be overcome by a high concentration of capsaicin or by the removal of extracellular Ca²⁺, as in the wild-type channel. In contrast, we found that this was not the case, since the S502A/T704I channel was completely insensitive to up to 30 μM capsaicin applied over the temperature range 25–50 °C.

To determine the specificity of the effects of isoleucine substitution at position 704, we further generated a double

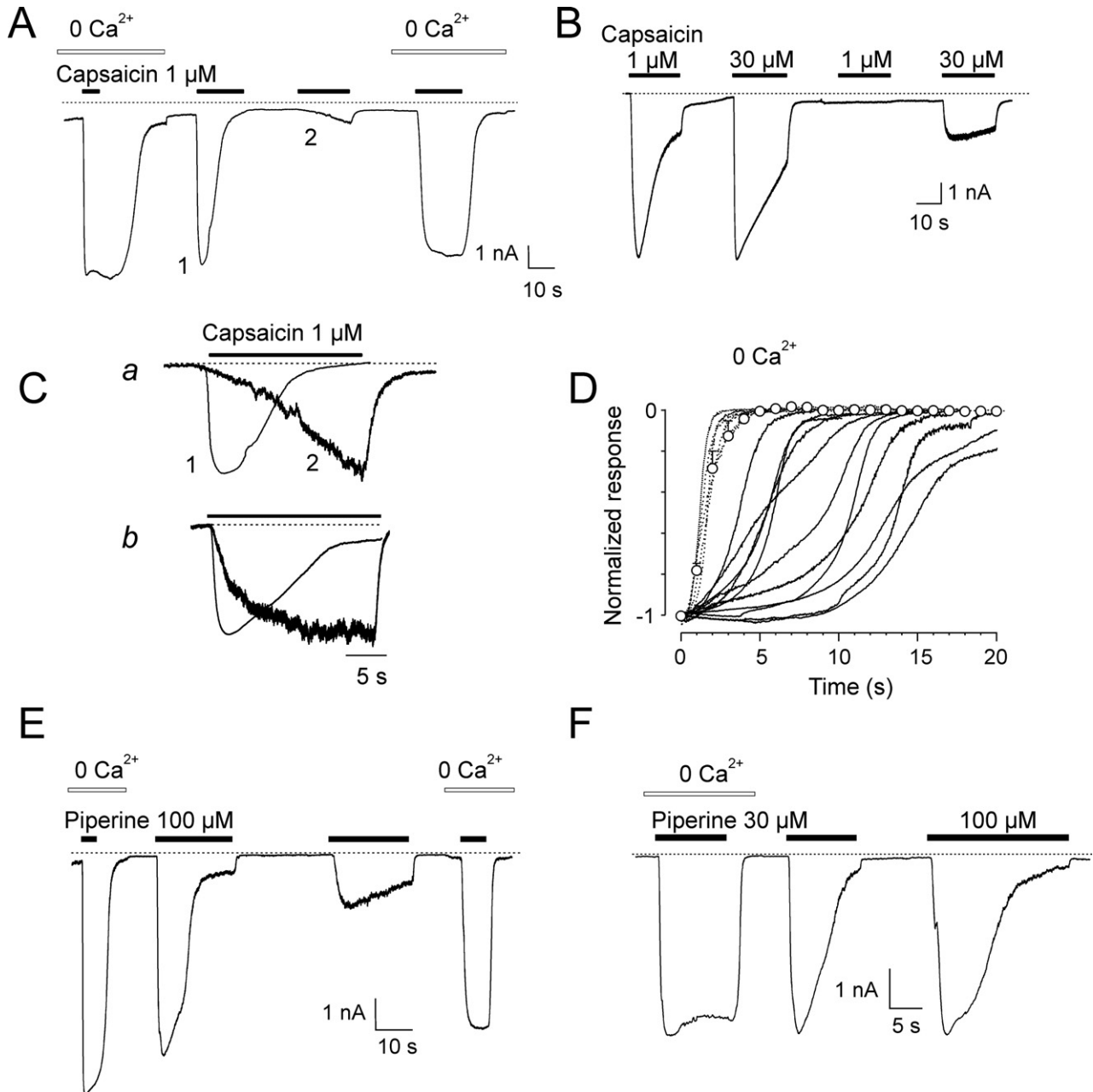


Fig. 2. Acute Ca^{2+} -mediated desensitization of TRPV1 slows the onset of capsaicin activation and accelerates the rate of deactivation of capsaicin-induced currents. (A) Sample recording of whole-cell current responses to consecutive applications of capsaicin ($1 \mu\text{M}$) in Ca^{2+} -free and in Ca^{2+} -containing bath solution. Bars above the records indicate duration of capsaicin and Ca^{2+} -free bath solution application. Dashed lines indicate zero current level. Holding potential -70 mV . The reduction in the magnitude of desensitized TRPV1-mediated currents was at least partially reversible in Ca^{2+} -free conditions. (B) Capsaicin applied at high concentration ($30 \mu\text{M}$) reactivates TRPV1 channels that had already been desensitized to $1 \mu\text{M}$ capsaicin in Ca^{2+} -containing bath solution. (C) Time course of TRPV1-mediated whole-cell currents before (1) and after (2) acute desensitization evoked by $1 \mu\text{M}$ capsaicin in two independent experiments (*a*, *b*) as described in A. Peak currents were normalized to the maximal value. (D) Time course of the deactivation currents evoked by $1 \mu\text{M}$ capsaicin in the absence of Ca^{2+} in nondesensitized (solid lines) channels and in the channels that were previously desensitized by $1 \mu\text{M}$ capsaicin applied for 20 s in the presence of Ca^{2+} (dotted lines and symbols). Representative traces were normalized to the amplitude measured before removing the capsaicin. Note that the deactivation currents had a clearly sigmoidal shape in the nondesensitized channels. (E) As for capsaicin, currents evoked by $30 \mu\text{M}$ piperine exhibited a substantial Ca^{2+} -dependent desensitization. (F) TRPV1 channels pre-desensitized by $30 \mu\text{M}$ piperine were completely reactivated by a higher ($100 \mu\text{M}$) concentration of the same agonist.

mutant S502A/T704A in which both putative consensus sites for CaMKII were replaced by alanine. This construct retained its specific sensitivity to all stimuli, including capsaicin, protons and heat, and desensitized like the wild

type (Fig. 3B–D). Receptors containing a singly substituted alanine at position 502 or isoleucine or alanine at position 704 had normal currents in response to capsaicin, pH and heat (data not shown). Thus, these results together with

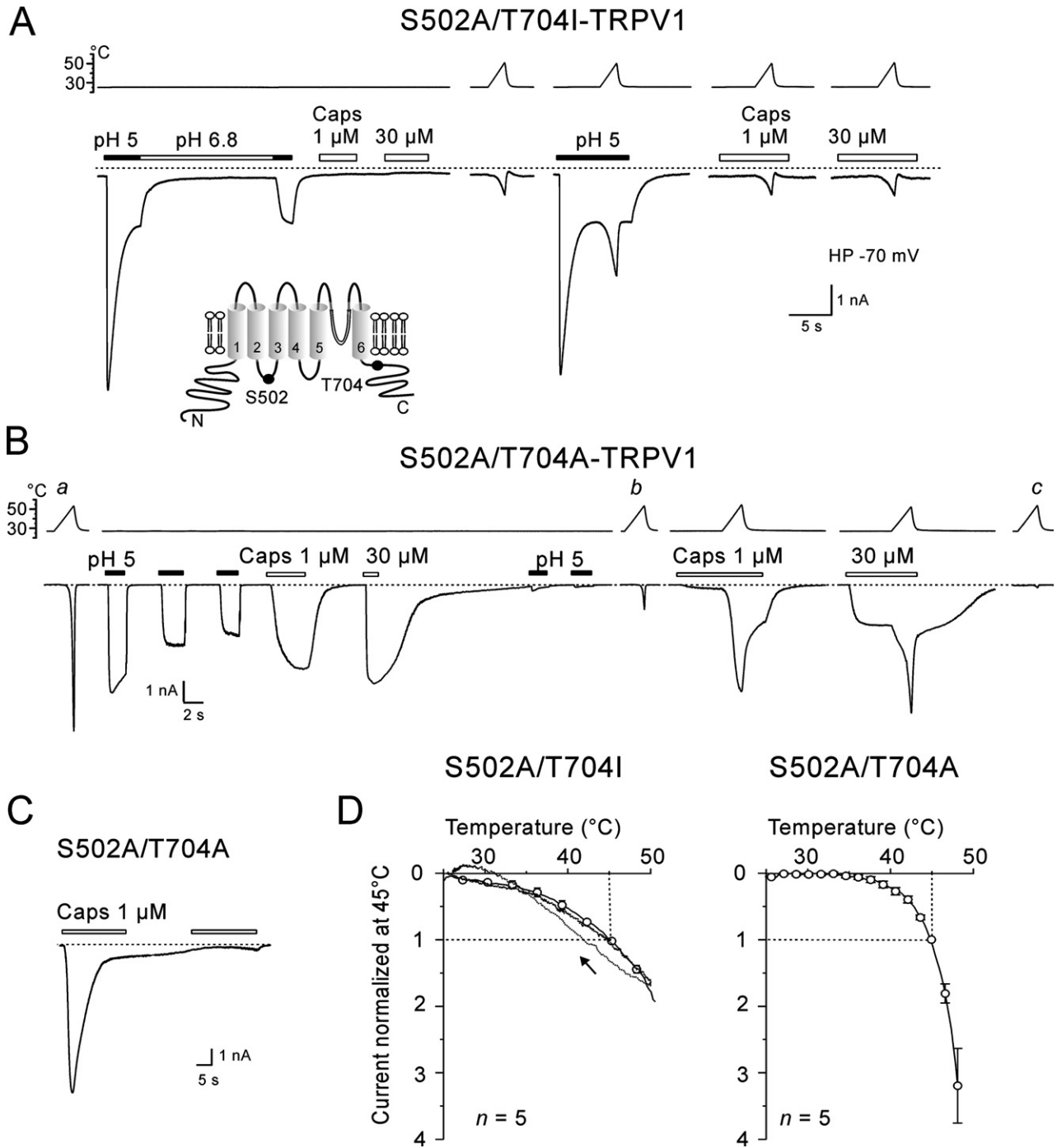


Fig. 3. Substitution S502A/T704A does not affect activation of TRPV1 by capsaicin, pH 5 and heat, whereas mutation S502A/T704I leads to loss of capsaicin-induced responsiveness. (A) Functional changes produced by a double mutation S502A/T704I at the two putative phosphorylation sites for CaMKII. Bath temperature plotted above, final temperature $\sim 48^\circ\text{C}$. Bars above the records indicate duration of capsaicin application. Dashed lines indicate zero current level. Holding potential -70 mV . (B) The S502A/T704A construct retained its specific sensitivity to all stimuli and, (C) it desensitized like the wild type. Note the decreased amplitude of the heat-evoked responses (a, b, c). (D) Averaged current–temperature relationships constructed from responses obtained from five independent recordings such as shown in A and B, normalized at 45°C . Note a small overshoot upon cooling a representative cell expressing S502A/T704I (dotted line).

those obtained by (Jung et al., 2004) suggest that a cooperative interaction between at least two distinct regions within the TRPV1 channel complex is required for its

proper functioning. In addition, T704 seems to lie at a location critical not only in terms of the effective binding of an agonist, but also in terms of channel gating per se.

Charge-neutralizing mutations within the TRP domain identify R701 as an important regulatory site for TRPV1

According to predictions based on statistical analyses of known phosphorylatable sequence fragments, arginine at position 701 is the specificity-determining factor for CaMKII-dependent phosphorylation at T704. The whole consensus phosphorylation site lies in the proximal C-terminal TRP domain adjacent to the inner pore helix S6. This region, among others, contains several conserved cationic residues that may interact with negatively charged membrane phospholipids such as PIP₂, since charge-neutralizing mutations at homologous positions markedly reduced the ability to bind PIP₂ in some other TRP family members (Rohacs et al., 2005; Qin, 2007). It has been recently reported that the activation of TRPV1 leads to a depletion of PIP₂ and that there must exist a correlation between the degree of Ca²⁺-dependent TRPV1 desensitization and the level of membrane PIP₂ (Liu et al., 2005). Since our data show that various mutations at T704 affect TRPV1 functionality in different ways, we wondered whether changes in local structure in the vicinity of this residue might underlie a weakened PIP₂–TRPV1 channel interaction and thus cause a desensitization of the channel. To test this possibility, we constructed three TRPV1 mutants in which positively charged residues at positions K698, R701 and K710 were individually replaced with a neutral amino acid, alanine. These residues are at analogous positions to K995, R998 and R1008, through which the related TRPM8 channel interacts with PIP₂ (Rohacs et al., 2005).

The charge-neutralizing mutations were found to have particularly pronounced effects on the capsaicin-induced currents through the TRPV1-R701A channel (Fig. 4). This mutation slowed the rate of capsaicin dissociation and the activation/deactivation kinetics dramatically at both depolarized and hyperpolarized potentials (Fig. 4A). To quantify the rates of activation and deactivation, which were not well described by a single exponential time constant, we measured the times to half-activation (16.3 ± 3.0 s and 4.4 ± 0.6 s) and half-deactivation (18.4 ± 5.8 s and 18.0 ± 3.9 s) for 1 μ M and 30 μ M capsaicin, respectively ($n=12$ and 7). R701A only exhibited small responses to heat with a shallow temperature dependence and, upon removal of external Ca²⁺, did not exhibit any sensitivity to 1 μ M capsaicin within the time frame of 20 s. This mutation rendered the channel completely unresponsive to pH 5 without eliminating the ability of protons to potentiate responses to capsaicin (Fig. 4C). The K698A and K710A mutants were functionally very similar to the wild-type TRPV1 channel with respect to their sensitivity to capsaicin, low pH and Ca²⁺-mediated desensitization (data not shown). Interestingly, at steady state the voltage-activated currents through all of the mutant channels tested resembled those of wild-type TRPV1 (Fig. 4D).

Replenishment of PIP₂ is not sufficient to rescue the TRPV1 channel from desensitization

The above results indicate that R701 may play a structural and/or functional role in regulating TRPV1 activity. One possibility is that it does so through interaction with membrane PIP₂. We therefore further examined the dynamics of PIP₂ in the plasma membrane during the Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1-mediated responses evoked by 1 μ M and 30 μ M capsaicin. We coexpressed the wild-type TRPV1 channel with the inward rectifier ion channel Kir2.1, the activity of which depends on membrane PIP₂ (Zhang et al., 1999). This approach was inspired by Liu et al. (2005), who demonstrated a temporal correlation of TRPV1 and Kir2.1 responses. In our experiments (with the pipette solution containing 2 mM ATP), the Kir2.1-mediated responses evoked by repeated exposure to a high-K⁺ solution (140 mM) exhibited large, sustained and remarkably stable currents for several minutes under control conditions (data not shown). In cells coexpressing the Kir2.1 and TRPV1 channels, 1 μ M and 30 μ M capsaicin were applied for 20 s in the extracellular solution containing 2 mM Ca²⁺. The TRPV1-mediated currents desensitized, and this was associated with a subsequent decrease in the Kir2.1-mediated currents (by >95%; $n=5$ cells), indicative of PIP₂ depletion (Fig. 5). Whereas the activity of Kir2.1 fully recovered within ~2 min after the removal of capsaicin, TRPV1 remained desensitized, suggesting that the replenishment of PIP₂ alone is not sufficient to rescue the channels from Ca²⁺-dependent desensitization. In agreement with the previous report (Liu et al., 2005), these data confirm that the activity of the TRPV1 channel influences the levels of membrane PIP₂, and thus it is possible that this desensitization might be a functional reflection of the PIP₂ depletion. More speculatively, it is possible that the side chain of the positively charged arginine residue at position 701 (that is strongly conserved in TRPM, TRPC and in TRPV1-3 channels) is a crucial residue in the interaction of the TRPV1 channel with membrane PIP₂.

DISCUSSION

TRPV1-activating stimuli, when applied alone, produce only submaximal activation, whereas the ceiling for maximal response can only be reached by their synergistic interaction at the TRPV1 receptor (Tominaga et al., 1998; Vlachova et al., 2001). In general, this unique polymodal activation property of TRPV1 hampers attempts to understand the intricacies underlying desensitization mechanisms, since the activation itself is an extremely complex and dynamic process involving multiple, interrelated and stimulus-dependent pathways. Over the past decade, a combination of molecular, biochemical, electrophysiological and pharmacological techniques has helped to identify some of these mechanisms. It has become apparent that TRPV1 desensitization, in both native and overexpression contexts, involves a predominant fast (acute) component that strongly depends on Ca²⁺ influx through the channel (Koplas et al., 1997; Piper et al., 1999; Mohapatra and Nau, 2003; Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al.,

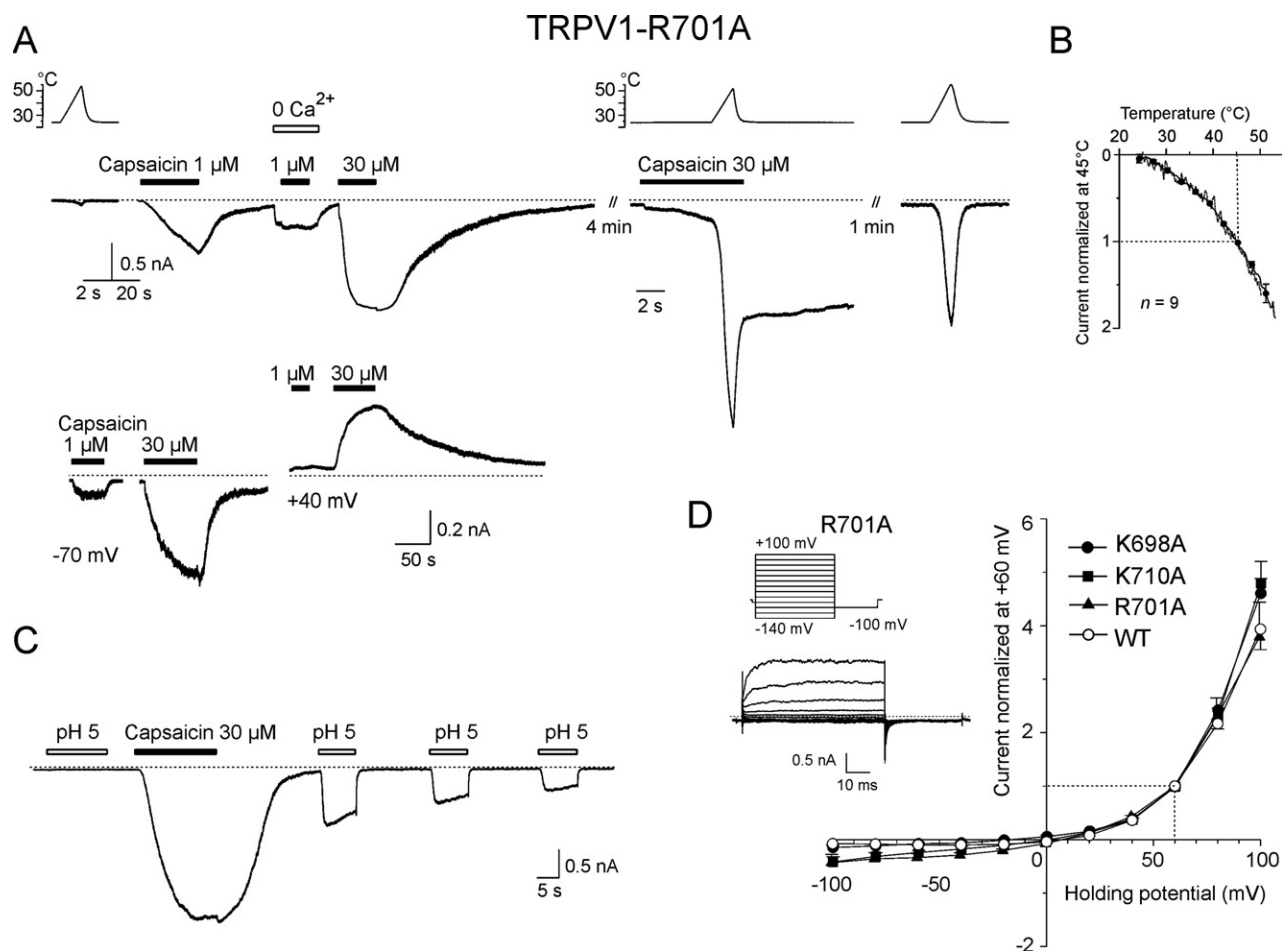


Fig. 4. Whole-cell recordings from HEK 293T cells transiently expressing TRPV1-R701A. (A) (Upper trace) Sample recording of whole-cell current responses to consecutive applications of a heat ramp (from 25 °C to 50 °C in 2 s) and capsaicin (1 μM) with a Ca²⁺-containing or Ca²⁺-free bath solution, and 30 μM capsaicin. After 4 min, the same cell was exposed to the heat ramp with 30 μM capsaicin and then with standard bath solution. Bars above the records indicate duration of application. Dashed lines indicate zero current level. Holding potential -70 mV. (A) (Lower trace) Responses of TRPV1-R701A to 1 μM and 30 μM capsaicin in the control Ca²⁺-containing extracellular bath solution obtained at a holding potential of -70 mV and at +40 mV. (B) Averaged current-temperature relationship constructed from the first heat-induced response obtained for each cell (n=9) in control extracellular solution, normalized at 45 °C. (C) The mutation R701A rendered the channel insensitive to pH 5 without eliminating the ability of protons to potentiate responses to 30 μM capsaicin. Holding potential -70 mV. (D) Voltage-induced responses of the charge-neutralizing mutants K698A, K710A and R701A compared with wild-type TRPV1. I-V relationships were obtained from steady state whole-cell currents measured at the end of 60-ms voltage steps from -140 to +100 mV. I-V graphs were constructed from four to five independent recordings obtained from wild-type TRPV1 (open circles), K698A (filled circles), K710A (filled squares) and R701A (filled triangles). The voltage protocol and a representative series of traces from R701A are shown in the inset. Error bars show the S.E.M.

2004), the phosphorylation status of the TRPV1 protein (Bhave et al., 2002, 2003; Numazaki et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2003, 2005; Jung et al., 2004), internal Ca²⁺ concentration (Koplas et al., 1997), and the membrane potential of the cell (Piper et al., 1999; Gunthorpe et al., 2000). A role for the aromatic tyrosine at position 671 within the internal pore of the TRPV1 channel has also been recently proposed by Mohapatra et al. (2003).

The present study provides evidence that acute Ca²⁺-dependent desensitization of the TRPV1 channel can be kinetically described by a sequential model in which the current influx through the open channel immediately leads to the closed (desensitized) state. Increasing the temperature from 25 °C to 35 °C speeds up the desensitization/resensitization rates so that the time course for equilibration can be captured within the time frame of the first 20 s

of capsaicin application. Several lines of evidence also contribute to the conclusion that desensitization might be a functional reflection of a decreased apparent affinity of the TRPV1 receptor for the ligand. First, the onset rate of the 1 μM capsaicin currents after desensitization was slower than that before the channels become desensitized, presumably reflecting a decreased association rate with the TRPV1 vanilloid-binding site. Second, in the desensitized channels, the current relaxation kinetics after the removal of capsaicin was strongly accelerated (approximately four-fold). Third, almost complete desensitization was at least partially overcome by higher concentrations of agonist. During the 20 s period of 30 μM capsaicin (100 μM piperine) application, the TRPV1-mediated currents measured in the Ca²⁺-containing bath solution declined to a lesser degree than those induced by 1 μM capsaicin (30 μM

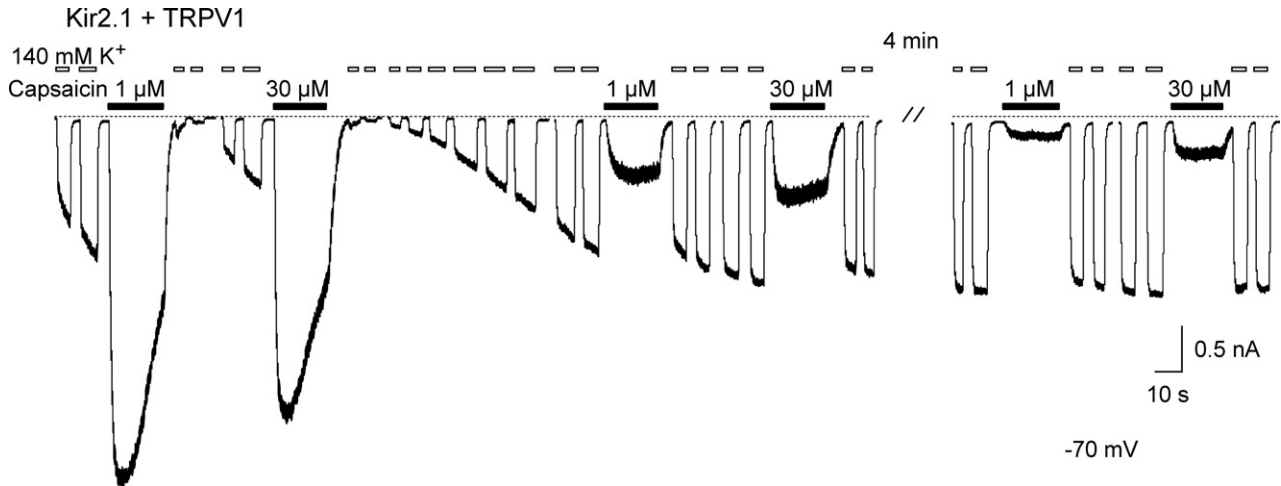


Fig. 5. Activation of TRPV1 leads to a depletion of membrane PIP_2 , however, its replenishment does not rescue the channels from acute Ca^{2+} -dependent desensitization. The inward rectifier Kir2.1 channel was coexpressed with TRPV1 to monitor the dynamics of PIP_2 in the plasma membrane. Kir2.1-mediated responses were evoked by repeated exposure to high- K^+ solution (140 mM). Currents elicited in response to 1 μM and 30 μM capsaicin were recorded in the extracellular solution containing 2 mM Ca^{2+} . Bars above the records indicate duration of capsaicin application. Dashed lines indicate zero current level. Holding potential -70 mV. Similar observations were obtained in five other cells.

piperine). To the best of our knowledge, this property of TRPV1 is unique and distinguishes this channel from previously described ligand-gated ion channels, like P2X, NMDA, AMPA, GABA_A , ACh or ASIC channels, in which a higher concentration of ligand usually leads to a higher degree of desensitization (Kardos and Nyikos, 2001; Dilger, 2002).

A reduced ability to bind vanilloids has been previously proposed to be the underlying cause of TRPV1 desensitization, and this process has been linked to a coincident dephosphorylation at the two putative consensus sites for CaMKII (Jung et al., 2004). However, our data on the nonphosphorylatable TRPV1-S502A/T704A mutant do not support this notion. Despite the clear effect of the double mutation of S502A/T704I on vanilloid binding, the threonine at position 704, which lies in the proximal region of the C-terminus (the TRP domain), does not seem to form part of the binding site (Jordt and Julius, 2002; Chou et al., 2004; Gavva et al., 2004). Our data suggest that the TRPV1-T704I channel recognizes the state of the specific serine S502, or, vice versa, the TRPV1-S502A channel distinguishes among specific mutations at T704. The function of this latter channel was considerably impaired upon the substitution of T704 by isoleucine but not by alanine, although neither of these two mutations is likely to affect the local structure around T704 (according to our comparative molecular modeling of the putative 3D structure of the TRPV1 C-terminal tail, based on the FHIT crystal structure published previously; Vlachova et al., 2003).

Generally, threonines are common in protein functional centers and their hydroxyl groups are quite reactive, being able to form hydrogen bonds with a variety of polar substrates. On the other hand, the alanine and isoleucine side chains are highly unreactive, and are thus rarely directly involved in protein function. The threonine to isoleucine substitution T704I introduces an additional hydrophobic residue among the three other neighboring hydrophobic

residues I703, I705 and L706. Thus it seems that the changes in the overall hydrophobicity of this region, rather than (de)phosphorylation, hydrogen bonding or bulkiness of the amino acid side chain, are important for the proper functioning of the TRPV1-S502A (but not the wild-type) channel. In particular, the short stretch of hydrophobic amino acids IXIL could be involved in the binding/recognition of hydrophobic ligands such as lipids.

Structurally, like other members of the TRP channel superfamily, TRPV1 channels are homotetramers assembled with fourfold symmetry around a centrally located aqueous pore (for a review, see Owsianik et al., 2006). Each subunit contains six transmembrane spanning domains (S1–S6) with a pore-lining P region linking the S5 and S6 domains. Although the atomic-resolution structure is not yet available for any of the TRP channels, it is generally assumed that their transmembrane topology is potentially analogous to the molecular architecture of the voltage-gated potassium channels: S1–S4 are putatively located on or close to the lipid-facing periphery of the tetrameric channel complex, whereas the S5 and S6 domains are positioned closer to the pore-forming channel core. The capsaicin molecule binds to the TRPV1 receptor at the channel-lipid interface between S3 and S4 and interacts with the residues around Tyr 511, not far from the “universal” phosphorylation site S502, positioned at the cytoplasmic loop linking S2 and S3. Our data suggesting that the roles of T704 and S502 are intimately linked indicate that these regions might also be located relatively close to one another.

The new findings of this study provide essential evidence in favor of an important functional role of the positively charged arginine residue at position 701 (R701) in regulating the activity of the TRPV1 channel. When mutated, this residue affects the chemical and thermal, but not the voltage sensitivity of the channel. There are several reasons to suppose that R701 might be involved in the

Ca²⁺-dependent desensitization. First, lying in the highly conserved TRP domain, which is strategically located close to the putative inner pore vestibule of the channel, this site seems to be generally important in modulating the gating of the channel. Second, being a part of the consensus sequence for CaMKII and PKC phosphorylation at T704, the basic R701 residue might regulate the Ca²⁺-dependent phosphorylation/dephosphorylation of the protein at this site. Third, the region around R701 is likely to be exposed to the surface of the cytosolic C-terminal tail and thus the side chain of this residue may electrostatically interact with another part of the protein, or with the negatively-charged phospholipids which are likely involved in the Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1. Fourth, the R701A mutation affects significantly the rate of dissociation of capsaicin from the channel (see Fig. 4A, C), which indicates that this residue is involved in agonist binding at TRPV1.

It is particularly important to relate our results to the finding of Bhavé et al. (2003) that the threonine residue at position 704 is critical for the activation of TRPV1 by phorbol esters. Such compounds might well be acting as co-agonists by interacting directly with the channel and so allosterically contribute to its gating. Our observation that high concentrations of capsaicin are able to fully reverse the activity of desensitized channels may reflect changes in bilayer elasticity or in the bilayer's hydrophobic thickness (Lundbaek et al., 2005). This mechanism of activation/inactivation also may explain why camphor at high concentrations activates and strongly desensitizes TRPV1 in a Ca²⁺-independent manner (Xu et al., 2005). Taken together, these results suggest that it is the hydrophobic burial within the region around T704 that could account for the alterations in the chemical and thermal sensitivity of the TRPV1 channel when it is dephosphorylated at S502. Positively charged R701 appears to be critical in this process.

Acknowledgments—The authors would like to express their gratitude to Dr. D. Julius (University of California, San Francisco, CA, USA) for providing the cDNA for rat TRPV1 and to Dr. Lily Jan (University of California, San Francisco, CA, USA) for mouse Kir2.1. We are grateful to Magda Kuntosova for technical assistance with cell culturing and to Rudiger Eitrich for consultation with comparative protein modeling. This work was supported by the Czech Science Foundation, 305/06/0319, 303/07/0915, the Research Project Fund of the AS CR, AV0Z50110509, AV0Z60870520, European Commission FP6 Specific Targeted Project "PHOTOLYSIS" LSHM-CT-2007-037765, and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, 1M0517, LC06010, MSM6007665808 and LC554.

REFERENCES

- Bhavé G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35: 721–731.
- Bhavé G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW (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: 12480–12485.
- Chou MZ, Mtui T, Gao YD, Kohler M, Middleton RE (2004) Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry (Mosc)* 43:2501–2511.
- Dilger JP (2002) The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br J Anaesth* 89:41–51.
- Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V (2006) Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* 151:178–185.
- Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW (1996) Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch* 431:828–837.
- Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, Treanor JJ (2004) Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 279:20283–20295.
- Gunthorpe MJ, Harries MH, Prinjha RK, Davis JB, Randall A (2000) Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol* 525 (Pt 3):747–759.
- Hui K, Liu B, Qin F (2003) Capsaicin activation of the pain receptor, VR1: Multiple open states from both partial and full binding. *Biophys J* 84:2957–2968.
- Jordt SE, Julius D (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108:421–430.
- Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U (2004) Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 279: 7048–7054.
- Kardos J, Nyikos L (2001) Universality of receptor channel responses. *Trends Pharmacol Sci* 22:642–645.
- Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS (1997) The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17:3525–3537.
- Liu B, Zhang C, Qin F (2005) Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25:4835–4843.
- Lundbaek JA, Birn P, Tape SE, Toombes GE, Sogaard R, Koeppe RE 2nd, Gruner SM, Hansen AJ, Andersen OS (2005) Capsaicin regulates voltage-dependent sodium channels by altering lipid bilayer elasticity. *Mol Pharmacol* 68:680–689.
- Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD (2004) Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 35:471–478.
- Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogalis BD, Tominaga M (2006) Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123:106–116.
- McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ (2005) Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol* 144:781–790.
- Mendes P (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput Appl Biosci* 9:563–571.
- Mendes P (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem Sci* 22:361–363.
- Mendes P, Kell D (1998) Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics* 14:869–883.
- Mohapatra DP, Nau C (2003) Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem* 278:50080–50090.

- Mohapatra DP, Nau C (2005) Regulation of Ca^{2+} -dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280:13424–13432.
- Mohapatra DP, Wang SY, Wang GK, Nau C (2003) A tyrosine residue in TM6 of the vanilloid receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. *Mol Cell Neurosci* 23:314–324.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C- ϵ and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277:13375–13378.
- Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M (2003) Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8002–8006.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:685–717.
- Pingle SC, Matta JA, Ahern GP (2007) Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol* (179):155–171.
- Piper AS, Yeats JC, Bevan S, Docherty RJ (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):721–733.
- Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Morenilla-Palao C, Ferrer-Montiel A (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch* 451:151–159.
- Premkumar LS, Ahern GP (2000) Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408:985–990.
- Qin F (2007) Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Handb Exp Pharmacol* (179):509–525.
- Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE (2005) $\text{PI}(4,5)\text{P}(2)$ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8:626–634.
- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE (2004) Ca^{2+} /calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123:53–62.
- Szallasi A, Cruz F, Geppetti P (2006) TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol Med* 12:545–554.
- Tominaga M, Tominaga T (2005) Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 451:143–150.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543.
- Vlachova V, Lyfenko A, Orkand RK, Vyklicky L (2001) The effects of capsaicin and acidity on currents generated by noxious heat in cultured neonatal rat DRG neurones. *J Physiol (Lond)* 3:717–728.
- Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Eitrich R, Vyklicky L (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 23:1340–1350.
- Xu H, Blair NT, Clapham DE (2005) Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* 25:8924–8937.
- Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE (1999) Activation of inwardly rectifying K^{+} channels by distinct $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ interactions. *Nat Cell Biol* 1:183–188.

(Accepted 7 August 2007)
(Available online 8 August 2007)

5.2 Mechanizmy působení oxidačních a redukčních látek na TRPV1 receptor

Studiem mechanismů působení oxidačních a redukčních látek na TRPV1 receptor jsme navázali na již publikované výsledky naší laboratoře, ve kterých byly podrobně analyzovány účinky redukční látky dithiotreitolu (DTT) na TRPV1 receptor. V pokusech s přirozeně se vyskytujícím TRPV1 receptorem na neuronech ganglií zadních kořenů míšních (DRG neuronech) a rekombinantním TRPV1 systémem na lidských embryonálních ledvinných buňkách (HEK buňky) jsme zjistili, že DTT v milimolárních koncentracích silně zvyšuje membránové proudy vyvolané kapsaicinem a bolestivým teplem (≥ 43 °C) (Vyklíčky et al., 2002). Také další studie potvrdila, že jsou oxidační a redukční látky (redox látky) skutečně schopné modulovat aktivitu TRPV1 receptoru (Jin et al., 2004). Nicméně zůstalo nejisté, zda jsou tyto účinky způsobeny přímou modulací S-H skupin proteinů TRPV1 kanálu. Pomocí radioligandů bylo prokázáno, že redox látky mohou snižovat afinitu a pozitivní kooperativitu vazby ligandu ($[^3\text{H}]$ reziniferatoxinu) na kanál (Szallasi and Blumberg, 1993; Szallasi et al., 1993) a že míra kooperativity mezi jednotlivými podjednotkami TRPV1 receptoru aspoň částečně podléhá modulaci těchto látek.

Studiem mechanismů působení oxidačních a redukčních látek na TRPV1 receptor jsme chtěli objasnit následující otázky:

- Je aktivita TRPV1 receptoru ovlivněna působením redukčních látek a pokud ano, jakým mechanismem tyto látky působí a jakou úlohu zde hrají extracelulární cysteiny z oblasti póru TRPV1?
- Bude TRPV1 stejně modulován působením jiné redukční látky, glutathionu (GSH), která je slabší a neprochází membránou na rozdíl od DTT?
- Jsou účinky redukčních látek přímé nebo se na nich podílí signální kaskády proteinkináz uvnitř buňky?
- Jaké jsou účinky oxidačních látek na TRPV1 a jsou úzce specifické na extracelulární cysteiny nacházející se v oblasti póru kanálu?
- Jaký je účinek alkylačního činidla N-ethylmaleimidu (NEM)?

- Jaký význam má studium oxidačně-redukčního stavu TRPV1 z hlediska přenosu bolesti?
- Jakým způsobem bude komplex mědi s 1.10-fenantrolinem (CuPhe) modifikovat TRPV1 a bude to zprostředkováno extracelulárními cysteiny z oblasti póru kanálu?

5.2.1 Působení redukčních látek

Z našich měření (Vyklícky et al., 2002) bylo zřejmé, že míra aktivace TRPV1 kanálu závisí na oxidačně-redukčním stavu jeho cysteinů. Pokud jsou cysteiny redukovány, poskytují jejich volné S-H skupiny vysokou vodivost a zvyšují pravděpodobnost otevření kanálu. Naopak, cysteiny v oxidovaném stavu jsou kovalentně spojeny S-S můstky a tato konformace může pro otevření kanálu představovat určitou bariéru. Zjistili jsme, že účinky DTT byly téměř okamžité, koncentračně závislé a vratné, a proto jsme testovali hypotézu, že tato látka působí prostřednictvím třech extracelulárních cysteinů, C616, C621 a C634, jež jsou součástí póru iontového kanálu.

Zajímalo nás, jakou úlohu hrají tyto cysteiny v DTT potenciaci TRPV1 receptoru a případně který z nich má klíčovou úlohu v tomto procesu. Proto jsme připravili molekulárně biologickými technikami 4 mutanty. Ve třech z nich byl vždy jeden cystein zaměněn za glycin (C616G, C621G a C634G). Ve čtvrtém mutantu byly zaměněny za glycin všechny tři cysteiny najednou (3CYS). Zjistili jsme, že u všech mutantů vyvolala aplikace 10 mM DTT potenciaci membránových proudů vyvolaných teplem, avšak u C621G a 3CYS byly odpovědi výrazně menší ve srovnání s C616G a C634G a wild typem TRPV1 receptoru, a rovněž u nich došlo k posunu teplotního prahu k nižším hodnotám. Překvapilo nás, že potenciace byla více snížena u C621G než u 3CYS, což odhalilo klíčovou úlohu cysteinu 621 v DTT potenciaci odpovědí na teplo.

Dále jsme se zabývali otázkou zda a do jaké míry cysteinové mutace TRPV1 kanálu ovlivňují vlastnosti jednotlivých mutantů při jejich aktivaci skokovými změnami membránového napětí, o němž je známo, že aktivuje TRPV1 receptor bez přítomnosti dalšího agonisty i při pokojové teplotě a normálním pH (pH 7.3) (Vlachova et al., 2003), (Voets et al., 2004b). Zjistili jsme, že při aplikaci depolarizačního napětí z -140 mV na +80 mV vykazoval 3CYS oproti wild typu rychlejší aktivační kinetiku (časová

konstanta $\tau_{\text{on}} = 11.6$ ms u 3CYS a $\tau_{\text{on}} = 21$ ms u wild typu), při aplikaci repolarizačního napětí z +80 mV na -70 mV vykazoval i rychlejší deaktivční kinetiku ($\tau_{\text{off}} = 1.7$ ms u 3CYS a $\tau_{\text{off}} = 2.5$ ms pro wild type). V těchto pokusech jsme pozorovali i posun střední hodnoty napěťové aktivace ($= V_{1/2}$) z 64.8 mV u wild typu na 95.5 mV u 3CYS. Při srovnání aktivační a deaktivční kinetiky cysteinových mutantů C616G, C621G a C634G s wild typem, nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v časových konstantách. Z těchto dat vyplývá, že záměna všech tří extracelulárních cysteinů v póru TRPV1 kanálu za glycin u 3CYS mutantu pozměnila jeho funkčnost.

Účinky DTT jsme porovnávali i s jinou redukční látkou, glutathionem (GSH), který je ve srovnání s DTT slabší a navíc neprochází plazmatickou membránou. Aplikace GSH (10 mM) měla u wild typu velmi podobný potenciační účinek jako měl DTT (10 mM) na membránové proudy vyvolané teplem nebo změnami membránového napětí. Avšak na rozdíl od DTT byl potenciační účinek GSH u 3CYS zcela zrušen. Na základě tohoto pozorování lze předpokládat, že redukční látky modulují TRPV1 kanál prostřednictvím cysteinů lokalizovaných na extracelulární straně plazmatické membrány. Zachovalou, ale slabou potenciaci vyvolanou DTT u 3CYS lze vysvětlit tím, že by DTT mohl mít přetrvávající nespecifické účinky, které nemusí souviset s jeho působením na S-H skupiny cysteinů.

Výsledky některých studií o NMDA a GABA_A receptorech ukazují, že by vratné účinky DTT mohly být způsobeny chelatací zbytkového množství divalentních kationů. Proto jsme provedli pokusy s wild typem a 3CYS mutantem, u nichž jsme aplikovali DTT (10 mM) v roztoku bez divalentních iontů (DVF roztok). Avšak i u těchto pokusů jsme zaznamenali potenciační účinek DTT na membránové proudy vyvolané teplem. Je proto zřejmé, že chelatace divalentních iontů není hlavní příčinou přetrvávající potenciace dithiotreitem.

Díky tomu, že je DTT membránově propustný, uvažovali jsme i o možnosti, že ovlivňuje TRPV1 receptor z intracelulární strany a působí i na další cysteiny, které TRPV1 receptor obsahuje. Tato hypotéza se zdá však méně pravděpodobná, protože uvnitř buňky se nachází velké množství GSH (≥ 10 mM v neuronu), díky kterému musí být většina buněčných proteinů v redukovaném stavu.

Uvnitř buňky se však také nacházejí serinové a threoninové aminokyselinové zbytky, které podléhají fosforylaci proteinkinázami A, C nebo CaMKII, čímž lze významně ovlivňovat aktivitu TRPV1 receptoru. Serin v pozici 502 (S502) podléhá

působení všech tří uvedených proteinkináz (Bhave et al., 2002), (Rathee et al., 2002), (Jung et al., 2004) a společně se serinem v pozici 800 (S800) jsou klíčovými aminokyselinami v procesu fosforylace působením proteinkinázy C (Numazaki et al., 2002). Abychom zjistili, zda DTT ovlivňuje fosforylační kaskádu některé z uvedených proteinkináz, připravili jsme mutant, ve kterých jsme nahradili S502 a S800 alaninem (S502A/S800A). Aplikace DTT (10 mM) na tento mutant rovněž potencovala membránové proudy vyvolané teplem, což znamenalo, že potenciační účinek DTT není zprostředkován signálními kaskádami uvedených proteinkináz.

5.2.2 Působení oxidačních látek

Na základě výsledků o působení redukčních látek na TRPV1 receptor nás dále zajímalo, do jaké míry mohou ovlivňovat jeho funkci oxidační látky a zda by mohly mít opačné účinky než redukční látky. Je známo, že malá oxidační látka diamid snadno difunduje plazmatickou membránou do buněk, kde oxiduje S-H skupiny glutathionu a ovlivňuje tak rovnováhu mezi oxidačními a redukčními procesy (Kosower et al., 1969). V našich pokusech jsme po krátké aplikaci (≤ 1 s) 1mM diamidu zaznamenali výraznou potenciaci proudových odpovědí vyvolaných bolestivým teplem i změnami membránového napětí včetně posunu prahu teplotní aktivace k nižším hodnotám. V pokusech s cysteinovými mutanty TRPV1 receptoru (C616G, C621G, C634G a 3CYS) zůstal jeho potenciační účinek také zachován, z čehož vyplynulo, že jeho účinek není pravděpodobně zprostředkován extracelulárními cysteiny.

Abychom podrobně objasnili mechanismus modulace TRPV1 receptoru oxidačními látkami, testovali jsme oxidační látku chloramin-T (Ch-T), který kromě cysteinů přednostně oxiduje methioniny na methioninsulfoxidy (Schlieff et al., 1996). Methionin na pozici 644 (M644) je u TRPV1 receptoru funkčně velice důležitý z hlediska propustnosti iontového kanálu (Garcia-Martinez et al., 2000), (Ferrer-Montiel et al., 2004), neboť leží uprostřed selektivního filtru póru TRPV1 kanálu a zdá se, že je nejvíce vystaven extracelulárnímu prostředí. Technikou bodové mutace jsme proto připravili mutant, u něhož byl methionin 644 nahrazen alaninem (M644A). Zjistili jsme, že aplikace 1mM chloraminu-T, podobně jako u wild typu, silně a nevratně senzitivizovala membránové proudy vyvolané teplem nejen u M644A, ale i 3CYS

mutantu. Z těchto výsledků by se dalo usuzovat, že se žádný ze tří extracelulárních cysteinů ani methionin 644 nepodílí na účincích chloraminu-T.

Abychom ověřili, do jaké míry jsou účinky oxidačních látek pro cysteiny specifické, zvolili jsme pro svá měření i oxidační látky, které působí na cysteiny specificky: membránově propustný peroxid vodíku (H_2O_2 , 10 mM) a membránově nepropustnou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB, 0,5 mM). Zjistili jsme, že peroxid vodíku (10 mM) potencoval membránové proudy vyvolané teplem. Tento účinek byl vratný. Působení DTNB nemělo žádný účinek na membránové proudy vyvolané bolestivým teplem, což naznačuje, že cysteiny umístěné na povrchu receptoru se buď neúčastní modulace oxidačními látkami, nebo se již vyskytují v oxidovaném stavu, a nemohou tedy další oxidaci podléhat.

5.2.3 Účinek alkylačního činidla N-ethylmaleimidu (NEM)

Alkylační látku N-ethylmaleimid (NEM) jsme použili k bližšímu objasnění, zda oxidační a redukční látky působí na TRPV1 kanál přímo modulací jeho citlivých míst nebo působí nepřímo tj. procesy, které nesouvisí s oxidací a redukcí. Zjistili jsme také, že NEM svou kovalentní vazbou na S-H skupiny cysteinů způsobuje nevratné změny ve struktuře proteinu a tím znemožňuje jejich oxidaci nebo redukcí. Zaznamenali jsme, že aplikace NEMu (1 mM) snížila membránové proudy vyvolané bolestivým teplem a že došlo k posunu teplotního prahu k nižším hodnotám ($\sim 30^\circ\text{C}$). Po několika minutovém promytí buňky kontrolním roztokem nedošlo po aplikaci 10 mM DTT k potenciaci membránových proudů, kterou jsme pozorovali v předchozích pokusech. Tím jsme dokázali, že NEM výrazně ovlivňuje funkci iontového kanálu, zřejmě změnami jeho struktury. Jestliže však byly NEM a DTT aplikovány společně, došlo k výrazné potenciaci membránových proudů jak v kontrolním roztoku, tak i při aplikaci DTT, a k posunu prahu teplotní aktivace ($\sim \leq 30^\circ\text{C}$). Tyto výsledky naznačují, že alkylační látka NEM specificky a nevratně reaguje s volnými S-H skupinami. Vzhledem k tomu, že tato modulace závisí na předchozí aplikaci DTT, domníváme se, že NEM způsobil alosterické a/nebo konformační změny TRPV1 kanálu, které se projeví ve zvýšené aktivitě kanálu a změnách jeho citlivosti vůči DTT. Zdá se proto velmi pravděpodobné, že oxidační a redukční látky působí na TRPV1 receptor přímo.

5.2.4 Oxidační látky snižují koncentraci aktivátorů iontových kanálů

Oxidační látky Hg^{2+} , DTNB, GSSH, H_2O_2 a thimerosal snižují u TRPV1 receptoru membránové proudy vyvolané kapsaicinem (Jin et al., 2004). V jiné studii bylo publikováno, že chloramin-T také inhibuje membránové proudy vyvolané 2-APB (100 μM), což je společný aktivátor TRPV1, TRPV2 a TRPV3 kanálů (Hu et al., 2004). Ve shodě s uvedenými nálezy jsme zjistili, že při společné aplikaci kapsaicinu a chloraminu-T došlo téměř na 100 % k inhibici membránových proudů i u wild typu TRPV1 a u 3CYS mutantu, C621G mutantu a M644A mutantu. To nás vedlo k podezření, že účinky oxidačních látek nemusí být způsobeny oxidací S-H skupin, ale oxidací samotného ligandu. Naše domněnka se potvrdila měřením vzorků 1 μM kapsaicinu v přítomnosti 1 mM diamidu a 1 mM chloraminu-T) vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (metoda HPLC), při níž jsme zjistili, že koncentrace kapsaicinu v přítomnosti oxidačních látek značně klesá. V případě diamidu až o 35 % a u chloraminu-T došlo dokonce ke 100 % vymizení. Tyto výsledky dokazují, že snížení membránových proudů vyvolaných kapsaicinem po aplikaci oxidačních látek, je způsobeno snížením jeho koncentrace v reakci a nikoliv oxidací S-H skupin příslušných aminokyselin TRPV1 receptoru. Ve fyziologických podmínkách je tedy možné, že ligandy vaniloidního receptoru mohou být oxidačními a redukčními látkami modifikovány *in vivo*. Z těchto důvodů se zdá být výhodnější studovat účinky redox látek na membránových proudech vyvolaných teplem ($\geq 42^\circ\text{C}$), kdy není k otevření kanálu zapotřebí vazba žádného ligandu.

5.2.5 Oxidační látka komplex kationů mědi s 1.10-fenantrolinem (CuPhe) působí jako blokátor TRPV1 kanálu

Komplex kationů mědi s 1.10-fenantrolinem (komplex CuPhe) je známou oxidační látkou a účinným katalyzátorem oxidací S-H skupin glutathionů a cysteinů na aktivních místech některých enzymů (Kobashi, 1968). Proto nás zajímalo, jakým způsobem by mohl komplex CuPhe modifikovat aktivitu TRPV1 receptoru. Vytvořili jsme hypotézu, že se komplex CuPhe může podílet na změnách v otevírání TRPV1 kanálu oxidací S-H skupin a vytvářením S-S můstků mezi cysteiny v oblasti jeho póru a

to v rámci jedné podjednotky, nebo mezi více podjednotkami, které tvoří iontový kanál (Gordon et al., 1997), (Rosenbaum and Gordon, 2002), (Schulte et al., 1998).

Ve výchozích pokusech jsme zjišťovali účinky komplexu CuPhe v koncentraci 100:400 μM na membránové proudy vyvolané bolestivým teplem ($\geq 47^\circ\text{C}$), které byly komplexem inhibovány na 20 % a aktivita TRPV1 receptoru se po odmytí kontrolním roztokem poměrně snadno navracela do svého původního stavu. Aplikace samotné mědi (100 μM CuSO_4) vyvolávala zvýšení membránových proudů vyvolaných teplem o 40 %, kdežto aplikace samotného 1.10-fenantrolinu (400 μM) neměla žádný významný účinek. Komplex CuPhe (100:400 μM) blokoval i membránové proudy vyvolané kapsaicinem (1 μM) při pokojové teplotě na 10 % a na rozdíl od membránových proudů vyvolaných bolestivým teplem byly odpovědi na kapsaicin blokovány i samotným 1.10-fenantrolinem (400 μM). Oproti účinkům komplexu CuPhe se po aplikaci samotného fenantrolinu navracely kapsaicinové odpovědi z blokády rychle následkem zvýšené teploty, což naznačuje nízkou afinitu TRPV1 kanálu pro fenantrolin (resp. pro nekomplexní formu). Aplikace nízkých koncentrací mědi (100 μM) nevykazovala žádné významné účinky na membránové proudy vyvolané kapsaicinem, avšak vyšší koncentrace (200 μM) tyto proudy potencovaly na 170 %.

Abychom objasnili význam membránového napětí v mechanismu účinku komplexu CuPhe na TRPV1 receptor, charakterizovali jsme membránové proudy vyvolané skokovými změnami membránového napětí (velikost skoku byla 20 mV z -80 mV na +80 mV) za současné aplikace kapsaicinu (1 μM). Komplex CuPhe v koncentraci 100:400 μM zcela blokoval tyto proudy v celém rozsahu membránového potenciálu, kdežto při desetkrát nižší koncentraci 10:40 μM byl jeho blokující účinek větší na negativních potenciálech ve srovnání s pozitivními, což naznačuje, že tato blokáda je napětově závislá. Aplikace samotného fenantrolinu (400 μM) vyvolala částečnou blokádu pouze na negativních potenciálech, což opět svědčí o napětově závislé blokádě.

Zjistili jsme, že pokud necháme působit komplex CuPhe (100:400 μM) dostatečně dlouho (~ 30 s) a pak jeho aplikaci ukončíme, neovlivní to následné odpovědi vyvolané aplikací nízkého pH. Avšak aplikace CuPhe současně s nízkým pH způsobí značnou blokádu membránových proudů, která má rozdílnou kinetiku nástupu v závislosti na membránovém napětí. Na negativním potenciálu -70 mV je rychlost nástupu blokády vyšší ($\tau_{\text{on}} = 150$ ms) kdežto na pozitivním potenciálu +40 mV je podstatně nižší (τ_{on}

= 750 ms), což jednoznačně prokazuje napět'ovou závislost blokády. Bylo otázkou do jaké míry je tato blokáda způsobena následkem účinků volné mědi nebo volného fenantrolinu, a použili jsme proto jako kontroly roztoky pH 5 buď se samotnou mědí (100 μM), nebo s fenantrolinem (40 a 400 μM). Na membránové proudy vyvolané pH 5 samotná měď (CuSO_4 100 μM) nepůsobila, kdežto samotný 1.10-fenantrolin (400 μM) blokoval odpovědi jak na negativních, tak na pozitivních potenciálech (na -70 mV o 36 %). Na základě kinetických studií blokády protonových odpovědí jsme prokázali, že rychlost blokování a odblokování je napět'ově a koncentračně závislá. Měřili jsme několik koncentrací komplexu CuPhe přičemž byl vždy zachován poměr 1:4 mezi mědí a fenantrolinem (10:40, 100:400 a 500:2000 μM). Čím byla koncentrace komplexu vyšší, tím byl nástup blokády rychlejší (CuPhe 10:40 μM : $\tau_{\text{on}} = 2.2 \pm 0.2$ s, CuPhe 500:2000 μM : $\tau_{\text{on}} = 117 \pm 22$ ms) a naopak návrat z této blokády pomalejší (CuPhe 10:40 μM : $\tau_{\text{off}} = 4.1 \pm 0.5$ s, CuPhe 500:2000 μM : $\tau_{\text{off}} = 10.0 \pm 2.1$ s). Z křivky koncentrační závislosti jsme stanovili $\text{IC}_{50} = 5.2$ μM (Cu:Phe = 5.2 : 20.8 μM) a Hillův koeficient 1.1.

Testováním účinků komplexu CuPhe (100:400 μM) na nativních TRPV1 kanálech přítomných na DRG neuronech jsme zjistili, že komplex inhibuje membránové proudy vyvolané bolestivým teplem (≥ 43 $^\circ\text{C}$) i kapsaicinem (1 μM) stejným způsobem jako u rekombinantního expresního systému TRPV1 na HEK buňkách. Tyto blokující účinky byly v obou případech téměř zcela vratné. CuPhe významně neovlivňoval proudové odpovědi vyvolané skokovými změnami membránového potenciálu. Tyto výsledky ukázaly, že komplex CuPhe blokuje jak rekombinantní, tak nativní TRPV1 kanály.

Abychom zjistili, zda mechanismus účinku CuPhe souvisí s přítomností extracelulárních cysteinů (C616, C621 a C634) v oblasti póru TRPV1 kanálu, použili jsme mutant, u kterého byly tyto tři cysteinové zbytky nahrazeny glycinem (3CYS). Komplex CuPhe (100:400 μM) blokoval u 3CYS mutantu membránové proudy vyvolané 1 μM kapsaicinem (na 1 %) i bolestivým teplem (na ~ 30 %) stejně jako u wild typu. Tyto nálezy vyloučily možnost, že CuPhe blokuje TRPV1 kanál modifikací S-H skupin extracelulárních cysteinů.

Zajímalo nás, zda i TRPM8, chladový kanál aktivovaný mentolem a nízkými teplotami (McKemy et al., 2002), (Peier et al., 2002), který je vzdáleně příbuzný k TRPV1, je blokován komplexem CuPhe. Zjistili jsme, že membránové proudy vyvolané specifickým agonistou TRPM8 receptoru mentolem (100 μM) byly blokovány

komplexe CuPhe (100:400 μ M) vratně a v závislosti na membránovém potenciálu. Z těchto výsledků je patrné, že póry TRPV1 a TRPM8 iontových kanálů mají podobné vlastnosti z hlediska blokujících účinků CuPhe a částečně shodný účinek lze předpokládat i u jiných TRP kanálů.

Naše studie tak prokázala, že komplex CuPhe blokuje TRPV1 kanál v otevřeném stavu koncentračně závislým způsobem. Blokující účinek CuPhe je vratný a není závislý na extracelulárních cysteinech. Téměř stejné účinky byly pozorovány na malých DRG neuronech aktivovaných kapsaicinem a bolestivým teplem. Vyloučili jsme také možnost, že by byl blokující účinek CuPhe způsoben oxidací extracelulárních cysteinů z oblasti póru TRPV1 kanálu neboť jsme v pokusech s 3CYS mutantem nezaznamenali oproti wild typu žádné výrazné změny v účincích CuPhe na membránové proudy vyvolané kapsaicinem, bolestivým teplem ani nízkým pH. Přikláníme se spíše k názoru, že velká pozitivně nabitá molekula komplexu CuPhe stericky blokuje ústí iontového kanálu. Podobný mechanismus blokády byl v nedávné době popsán u sodíkových kanálů (Popa and Lerche, 2006).

Účinky komplexu CuPhe nebyly závislé na způsobu aktivace receptoru (kapsaicin, nízké pH nebo bolestivé teplo). To dokazuje, že CuPhe nebude pravděpodobně kompetovat s kapsaicinem či protony o vazebná místa nebo se vázat na doménách odpovědných za konformační změny vedoucí k aktivaci kanálu teplem.

Námi zjištěné rozdíly mezi rychlou kinetikou blokády a pomalou kinetikou návratu z blokády působením komplexu CuPhe (100:400 μ M) na membránové proudy vyvolané nízkým pH lze vysvětlit tím, že CuPhe co by velká pozitivní molekula bude snadněji vstupovat do kanálu je-li je otevřen a obtížně ho bude opouštět když je zavřený. Bylo obtížné rozhodnout zda zbytkové proudy pozorované v přítomnosti CuPhe mohou být přisuzovány aktivitě kanálu, nebo jsou tyto membránové proudy následkem nespecifických účinků zvýšené teploty na kanálech, které se nacházejí v plazmatických membránách buněk. Přesto byly účinky CuPhe rychle vratné což naznačuje, že zvýšená teplota, která otevírá kanál, přispívá k rychlosti návratu z blokády. Je tedy možné, že kromě dnes již známých nekompetitivních antagonistů TRPV1 kanálu, může být komplex CuPhe považován za další účinný blokátor iontových kanálů potenciálně použitelný v dalším studiu vztahů struktury a funkce TRPV1 a zřejmě i jiných TRP kanálů.

5.2.6 Význam oxidačně-redukčního stavu TRPV1 z hlediska přenosu bolesti

Bylo prokázáno, že během evoluce docházelo tvorbou disulfidických můstků (S-S) ke zvyšování teplotní stability různých proteinů, avšak vyskytly se i proteiny s novými disulfidickými vazbami, u nichž byla teplotní stabilita naopak snížena (Petersen et al., 1999). V přítomnosti oxidačních i redukčních látek je práh pro teplotní aktivaci TRPV1 kanálu značně snížen a blíží se fyziologickým hodnotám teploty lidského těla, což naznačuje, že ke svému fungování zřejmě TRPV1 kanál vyžaduje určitý optimální oxidačně-redukční stav. Při jeho porušení, ke kterému dochází v periférii při různých patofyziologických podmínkách (poškození tkáně, metabolický stres a zánět), dochází díky tomu i ke změnám fungování TRPV1 kanálu a k senzitivaci nociceptorů. Zdá se tedy, že změny v oxidačně-redukčním stavu TRPV1 kanálu by se mohly významně podílet na patogenezi akutních a chronických stavů bolesti. Uvedené mechanismy by mohly objasňovat příčiny vzniku bolesti doprovázející např. dočasný arteriální uzávěr. Klinicky je tento příznak znám jako *angina pectoris*, jestliže jde o srdeční sval, nebo *claudicatio intermitens*, jestliže jde o uzávěr tepen dolních končetin, s nímž se setkáváme u Búrgerovy choroby. Bolest se objevuje po námaze tj. v situacích, kdy lze předpokládat zvýšenou spotřebu kyslíku. Při znalosti základních mechanismů aktivace TRPV1 receptoru se jeví možnými dva způsoby vzniku bolesti. Předně vznik kyselého prostředí vlivem zvýšení koncentrace kyseliny máselné v důsledku anaerobního rozkladu glykogenu, nebo přímým působením anoxie na S-H skupiny cysteinů, jichž je v jedné podjednotce TRPV1 receptoru 18 (z nichž 3 jsou v bezprostředním kontaktu s extracelulárním prostředím). Volné S-H skupiny cysteinů v oxidovaném stavu vytvářejí disulfidické můstky (S-S), které se podílejí na tvorbě sekundární i terciární struktury bílkovin. Kovalentní vazba je zpravidla pevná, ale lze ji rozrušit v prostředí, jež obsahuje nedostatek kyslíku.

Reducing and Oxidizing Agents Sensitize Heat-Activated Vanilloid Receptor (TRPV1) Current

Klara Susankova, Karolina Tousova, Ladislav Vyklicky, Jan Teisinger, and Viktorie Vlachova

Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received February 1, 2006; accepted April 13, 2006

ABSTRACT

We have previously reported that the reducing agent dithiothreitol (DTT) strongly increases thermally induced activity of the transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1) channel. Here, we show that exposure to oxidizing agents also enhances the heat-induced activation of TRPV1. The actions of sulfhydryl modifiers on heat-evoked whole-cell membrane currents were examined in TRPV1-transfected human embryonic kidney 293T cells. The sensitizing effects of the membrane-permeable oxidizing agents diamide (1 mM), chloramine-T (1 mM), and the copper-*o*-complex (100:400 μ M) were not reversed by washout, consistent with the stable nature of covalently modified sulfhydryl groups. In contrast, the membrane-impermeable cysteine-specific oxidant 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (0.5 mM) was ineffective. The alkylating agent *N*-ethylmaleimide (1 mM) strongly and irreversibly af-

ected heat-evoked responses in a manner that depended on DTT pretreatment. Extracellular application of the membrane-impermeable reducing agent glutathione (10 mM) mimicked the effects of 10 mM DTT in potentiating the heat-induced and voltage-induced membrane currents. Using site-directed mutagenesis, we identified Cys621 as the residue responsible for the extracellular modulation of TRPV1 by reducing agents. These data suggest that the vanilloid receptor is targeted by redox-active substances that directly modulate channel activity at sites located extracellularly as well as within the cytoplasmic domains. The results obtained demonstrate that an optimal redox state is crucial for the proper functioning of the TRPV1 channel and both its reduced and oxidized states can result in an increase in responsiveness to thermal stimuli.

The capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1) is a sensory neuron-specific ion channel that plays an important role in thermal nociception and inflammatory hyperalgesia (Caterina et al., 1997). This channel can be activated by vanilloid compounds, low pH, and noxious heat, and its function is modulated by a wide range of endogenous and exogenous agents (for review, see Planells-Cases et al., 2005). Among them, redox-active substances have recently been shown to modulate TRPV1 receptor activity (Vyklicky et al., 2002; Jin et al., 2004); however, it is not yet clear whether these effects are mediated through the direct modification of sulfhydryl groups present in the TRPV1 channel protein complex. As demonstrated by earlier

radioligand binding studies, both the reducing and oxidizing agents diminished the apparent affinity and positive cooperativity characteristic of [³H]resiniferatoxin binding (Szallasi and Blumberg, 1993; Szallasi et al., 1993). From these studies, it has become apparent that cooperation between the TRPV1 subunits is, at least in part, subject to redox modulation. Also, our earlier studies demonstrated that the sulfhydryl redox agent dithiothreitol (DTT) strongly potentiates both the native and recombinant rat TRPV1 channel when applied at millimolar concentrations to the external solution under intact whole-cell conditions. Since the effects of DTT were almost immediate, dose-dependent, and reversible, the contribution of extracellular cysteine residues within the putative pore-loop region of TRPV1, Cys616, Cys621, and Cys634 has been proposed (Vyklicky et al., 2002). In an attempt to identify the mechanisms involved in the redox modulation of TRPV1 channel, the effects of an oxidizing agent, copper-*o*-phenantroline [Cu(II)-1,10-phenantroline; Cu:Phe], on heat-induced membrane currents were studied in human embryonic kidney (HEK) 293T cells expressing rat

This work was supported by the Czech Science Foundation grants 305/06/0319 and 309/04/0496, the Research Project Fund of the Academy of Sciences on the Czech Republic grant AV0Z 5011922, and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic grants 1M0517 and LC 554.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.106.023069.

ABBREVIATIONS: TRPV1, transient receptor potential vanilloid receptor-1; DTT, dithiothreitol; Cu:Phe, copper-*o*-phenantroline [Cu(II)-1,10-phenantroline]; HEK, human embryonic kidney; PCR, polymerase chain reaction; DVF, divalent-free; GSH, reduced glutathione; DTNB, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid); ECS, extracellular solution; NEM, *N*-ethylmaleimide; HPLC, high-performance liquid chromatography; Ch-T, chloramine-T; WT, wild-type/wild type.

TRPV1. However, a detailed examination of these effects has shown that this oxidant exerts its strong inhibitory effect mainly through a steric block of the TRPV1 channel rather than by redox modulation (Tousova et al., 2004). The recent demonstration that oxidizing agents such as thimerosal decrease the capsaicin-induced TRPV1 activity by oxidation of extracellular sulfhydryl residues (Jin et al., 2004), namely, the cysteine Cys621, seemed to be in line with this idea. However, the results of the latter study were obtained with oxidizing agents coapplied with capsaicin, which may cast doubt as to whether these compounds may or may not affect the capsaicin molecule directly, since the alkyl side chain of capsaicin is considered to be susceptible to enzymatic oxidation (Boersch et al., 1991). Therefore, it seems that a more advantageous strategy could be to explore the effects of redox-active substances on the heat-dependent mode of TRPV1 receptor activation.

The goal of this investigation was to characterize the effects of redox-active substances on the TRPV1 receptor and to determine the mechanisms by which these reagents affect the heat-induced activity of this channel. The results presented here indicate that both reducing and oxidizing agents enhance the heat-evoked currents mediated by these channels. We also show that the effects of reducing agents are at least partially attributable to modifications taking place at specific thiol-sensitive sites on the extracellular side of the TRPV1 receptor pore-forming loop.

Materials and Methods

Cell Culture and Transfection. HEK293T cells (SD 3515; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were cultured in OPTI-MEM I (Invitrogen, Paisley, Scotland) supplemented with 5% fetal bovine serum. Cells were plated on to dishes coated with collagen at a density $\sim 180,000$ cells cm^{-2} . 293T cells were transfected transiently with 300 to 400 ng/dish recombinant plasmid DNA encoding wild-type or mutant rat TRPV1 in pcDNA3 vector (wild type kindly provided by D. Julius, San Francisco, CA) using either the LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) or Magnet-assisted transfection (IBA GmbH, Göttingen, Germany) method according to the manufacturers' protocols. To identify the transfected cells in the electrophysiological experiments, DNA plasmid encoding green fluorescent protein (GFP) in pQBI 25 vector (TaKaRa, Kyoto, Japan) was cotransfected at a concentration of 400 ng/dish. Transfected cells were replated onto glass coverslips (three 12-mm coverslips per 35-mm dish) coated with collagen and poly-L-lysine. Electrophysiological experiments were performed 24 to 48 h after transfection. For each experimental group, five to eight GFP-positive cells per coverslip were studied from at least three different (independent) transfections.

Construction of C616G, C621G, C634G, and 3Cys Mutants of TRPV1. Rat TRPV1 mutants were constructed by PCR amplification using rat TRPV1-specific primers synthesized to contain a point mutation converting the respective nucleotides at positions Cys616, Cys621, and Cys634 to Gly616, Gly621, and Gly634. The QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) was used according to manufacturer's protocol to perform point mutations in TRPV1. The overlapping primer pairs were as follows: TRPV1-C616G, 5'-G TCC ACA CCA CAC AAG GGC CGG GGG TCT GCC TGC AAG CC-3' (sense) and 5'-GCA GGC AGA CCC CCG GCC CTT GTG TGG TGT GGA CTC C-3' (antisense); TRPV1-C621G, 5'-GC CGG GGG TCT GCC GGC AAG CCA GGT AAC TCT TAC AAC-3' (sense) and 5'-GA GTT ACC TGG CTT GCC GGC AGA CCC CCG GCA CTT GTG-3' (antisense); TRPV1-C634G, 5'-C AAC AGC CTG TAT TCC ACA GGT CTG GAG CTG TTC AAG TTC-3' (sense)

and 5'-CTT GAA CAG CTC CAG ACC TGT GGA ATA CAG GCT GTT GTA AG-3' (antisense). Using the TRPV1-C634G as a template, the following primer pair was designed to mutate the remaining two extracellularly located cysteines: TRPV1-3'CYS, 5'-G TCC ACA CCA CAC AAG GGC CGG GGG TCT GCC GGC AAG CCA GGT AAC TCT TAC-3' (sense; 52-mer) and 5'-GTA AGA GTT ACC TGG CTT GCC GGC AGA CCC CCG GCC CTT GTG TGG TGT GGA C-3' (antisense).

Construction of S502A/S800A and M644A Mutants of TRPV1. Double mutant S502A/S800A was constructed by two PCR reactions. In a first reaction, TRPV1-S800A, the following primer pair was used with TRPV1 as a template: 5'-CTT CTG AGG GAT GCA GCC ACT CGA GAT AGA CAT GC-3' (sense) and 5'-GC ATG TCT ATC TCG AGT GGC TGC ATC CCT CAG AAG-3' (antisense). In the second reaction, TRPV1-S800A was used as a template and the overlapping primer pair was as follows: TRPV1-S502A/S800A, 5'-CTG CAG AGG CGA CCA GCC CTC AAG AGT TTG TTT G-3' (sense) and 5'-C AAA CAA ACT CTT GAG GGC TGG TCG CCT CTG CAG-3' (antisense). To construct TRPV1-M644A mutant, the following primer pair was used: 5'-C AAG TTC ACC ATC GGC GCG GGC GAC CTG GAG TTC-3' (sense) and 5'-GAA CTC CAG GTC GCC CGC GCC GAT GGT GAA CTT G-3' (antisense).

Base changes introducing glycine or alanine are in bold. All site-directed mutated constructs were confirmed by DNA sequencing using an automated sequencer (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Electrophysiology. Whole-cell membrane currents were recorded by using an Axopatch-1D amplifier and the pCLAMP8 and pCLAMP9 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Electrodes were pulled from borosilicate glass and after filling had a resistance of 4 to 6 M Ω . The series resistance was usually less than 10 M Ω and was compensated to $\sim 80\%$. A system for fast superfusion of the cultured cells was used for drug and heat application. It consisted of a manifold of seven fused silica capillaries connected to a common outlet made from a glass capillary around which insulated copper wire (20 μm in thickness) was coiled to pass direct current for heating the solutions superfusing the cell under investigation (Ditert et al., 2006). The temperature of the superfusing solution was measured by a miniature thermocouple inserted into the outlet capillary near to its orifice that was placed less than 100 μm from the cell under investigation.

Reagents and Solutions. Before and after the test solutions, the cells were superfused with control extracellular solution of the following composition: 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, and 10 mM glucose; pH was adjusted to 7.3 with NaOH. The divalent-free (DVF) extracellular solution contained 160 mM NaCl, 10 mM HEPES, and 10 mM EDTA; pH was adjusted to pH 7.4 with NaOH. The intracellular pipette solution contained 125 mM Cs-gluconate, 15 mM CsCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.5 mM CaCl_2 , and 2 mM MgATP, pH was adjusted to 7.3 with CsOH. The osmolarities of the extracellular and the intracellular solution were 320 and 290 mOsm. Unless otherwise specified, all chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Capsaicin solution was prepared from a 0.1 M stock solution in ethanol, stored at -20°C . The final concentration of ethanol was $<0.001\%$. DTT, H_2O_2 , glutathione (GSH), and diamide were prepared from a stock solution of 1, 10, and 1 M, respectively, in distilled water; the final dilutions were used for about 8 h. *N*-Ethylmaleimide (NEM) was freshly prepared before each experiment from a stock solution of 2 M in ethanol. The final concentration of ethanol was $<0.05\%$. DTNB was diluted directly into the bath solution to achieve the final concentration. The experimental extracellular solutions containing the redox reagents were prepared, and the pH was adjusted immediately before use and checked after the experiments.

Chromatographic Separation of Capsaicin. Chromatographic separation of capsaicin was done on an HPLC-mass spectrometer system (Agilent 1100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped

with a mass spectrometric detector (quadrupole MSD). Separation was done on Extend C18 (2.1×150 mm; $5 \mu\text{m}$) column at 46°C . Elution was made by gradient between mobile phase A (water with 0.1% heptafluorbutyric acid) and B (acetonitrile with 0.085% heptafluorbutyric acid). Gradient started with 5% B and reached 50% B at 10 min, after next 30 min 100% B was achieved. Flow rate was 0.25 ml/min. Condition for mass spectrometric detection was set to drying gas (N_2) flow, 10 l/min; nebulizer pressure, 20 psig (138 kPa); drying gas temperature, 350°C ; capillary voltage, 4000 V; and fragmentor, 70 V (positive polarity, selective ion monitoring at $306 m/z$). Under these conditions, the retention time of capsaicin was 17.8 min. Capsaicin concentration changes were quantified as the peak area ratios between the analyte and the internal standards measured at selective ion monitoring at $306 m/z$.

Statistical Analysis. Heat-evoked currents sampled at the rising phase of the temperature ramp were pooled every 0.5°C . Data were routinely discarded if the leak exceeded 5% of the maximum heat induced currents, but for all the data in the DTT experiments, the leak currents were less than 1% of the maximum current; therefore, no leak subtraction was used. Voltage dependence of the open probability, P_o , was estimated according to the Boltzmann equation (Nilius et al., 2005): $I_{\text{tail}} = I_{\text{max}}/(1 + \exp(-zF(V - V_{1/2})/RT))$; $P_o = I_{\text{tail}}/I_{\text{max}}$, where z is valence of the gating charge; $V_{1/2}$ is the half-activation voltage; I_{max} is the extrapolated maximum tail current; and F , R , and T have their usual thermodynamic meaning. Boltzmann fits were achieved with Clampfit 9 (Axon Instruments) software. All data are expressed as the mean \pm S.E.M. Overall statistical significance was determined by analysis of variance, if not stated otherwise. In case of significance ($*p < 0.05$ or $***p < 0.001$), statistical comparisons were performed by Student's t test for individual groups.

Results

Mutation of Cys621 in TRPV1 Reduces DTT-Induced Potentiation of Heat-Activated Ionic Currents. We have recently demonstrated that the external application of 10 mM DTT to native and recombinant rat TRPV1 receptors markedly potentiates the heat and capsaicin-induced membrane currents (Vyklicky et al., 2002). Because the TRPV1 receptor contains three extracellular cysteine residues (Cys616, Cys621, and Cys634) that could potentially be involved in redox modulation, we substituted these residues with glycine either individually or as a triple mutant (3CYS) and tested the effects of redox-active substances on the whole-cell membrane currents induced by heat. Heat-activated inward currents were induced by 3-s ramps of increasing temperature from 24 – 48°C at -70 mV in an extracellular control solution and in the presence of 10 mM DTT (10 s). The cells were then washed with bath solution, and the reversibility of the observed effects was determined 1 min later (Fig. 1A). The heat-induced responses of the mutant channels were indistinguishable from those of the wild-type controls. In the presence of DTT, heat-activated currents were potentiated in all constructs over the temperature range of 37 – 47°C ; however, this effect was significantly reduced in the C621G and 3CYS mutants ($*p < 0.05$). As shown in Fig. 1B, wild-type TRPV1, C616G, and C634G were potentiated by 2.2 ± 0.4 , 2.8 ± 0.6 , and 1.8 ± 0.1 at 45°C ($n = 13$, 7 , and 9 , respectively), which was greater than the 1.2 ± 0.1 and 1.4 ± 0.1 potentiation produced by DTT in the C621G and TRPV1-3CYS mutants ($*p < 0.05$; $n = 11$ and 16).

In the wild type, C616G, and C634G, DTT shifted the threshold for heat activation so that 38°C was sufficient to induce 23 ± 7 , 17 ± 7 , and $20 \pm 3\%$, respectively, of the

maximal response induced at 47°C in the control extracellular solution. Unexpectedly, the reduction in DTT-induced potentiation of the heat-induced responses was highest in the C621G mutant, not in 3CYS-TRPV1 ($*p < 0.05$). These findings suggest that the cysteine residue at position 621 is indeed involved in the modulation of the TRPV1 channel by DTT on the extracellular side. Furthermore, the data indicate that the triple mutation of all extracellular cysteine residues (3CYS) has a noticeable impact on TRPV1 functionality, and this could account for the observation that DTT affects the 3CYS channel slightly more than the C621G mutant.

Voltage-Dependent Activation of Mutant Channels C616G, C621G, C634G, and 3CYS-TRPV1. Since the interpretation of mutagenesis studies may be confounded by functional changes induced by the mutations themselves, we investigated the overall function of the cysteine mutant constructs. The expression levels of the mutants were assessed by comparison of current densities pA/pF of the initial heat response measured at a holding potential of -70 mV and at 44 – 45°C . Although quite variable, the median inward current densities obtained in cells overexpressing the cysteine mutants (-83 pA/pF, $n = 13$; -48 pA/pF, $n = 10$; -61 pA/pF, $n = 19$; -69 pA/pF, $n = 10$ in C616G, C621G, C634G, and 3CYS, respectively) were not significantly different from those seen in cells transfected with wild-type TRPV1 (-50 pA/pF; $n = 22$; $*p = 0.75$). Cells transfected with either of the mutant receptors gave responses to heat stimuli that were indistinguishable from those of the wild-type channels (Fig. 1A). Given the high degree of cell-to-cell variability in TRPV1 expression and in the magnitudes of capsaicin-evoked currents within each experimental group, we were also unable to detect any obvious changes in the kinetics of the membrane currents induced by capsaicin ($1 \mu\text{M}$; data not shown). At room temperature and normal pH (7.3), the rat-cloned TRPV1 can be activated by depolarizing voltages in the absence of any agonists (Vlachova et al., 2003; Voets et al., 2004), and this mode of activation is linked to conformational changes associated with the temperature-dependent gating of the TRPV1 channel (Voets et al., 2004; Nilius et al., 2005). We therefore examined the voltage-dependent gating properties of the mutant channels by recording whole-cell membrane currents induced by a sequentially applied series of 100-ms voltage steps ranging from -140 to $+80$ mV, in $+20$ -mV increments.

In the wild-type and 3CYS-TRPV1 channels, depolarizing voltage steps elicited large outward membrane currents with a maximum amplitude of 4.4 ± 0.9 nA ($n = 13$) and 3.9 ± 0.7 nA ($n = 16$) at $+80$ mV ($*p = 0.653$). The activation kinetics of wild-type TRPV1-mediated currents elicited by a depolarizing step from -140 to $+80$ mV was described by a single exponential function ($\tau = 21.0 \pm 2.0$ ms). As shown in Fig. 1, C and D, the 3CYS mutation produced a channel with significantly faster voltage-dependent gating kinetics ($\tau = 11.6 \pm 1.2$ ms; $***p < 0.001$).

Repolarization to the holding membrane potential (-70 mV) produced pronounced inward "tail currents". Detailed analysis of wild-type TRPV1 deactivation kinetics revealed a fast (2.5 ± 0.2 ms) and a slow (15.8 ± 2.7 ms) time constant with a relative contribution of $74 \pm 5\%$ for the fast deactivating component. Again, 3CYS-TRPV1 exhibited significantly faster deactivation rates than those of the wild type

channels (1.7 ± 0.1 ms; $76 \pm 3\%$; ***, $p < 0.001$), whereas the slow time constant was not significantly changed (14.6 ± 1.2 ms; *, $p = 0.677$). We further examined to what extent the individual mutations could be responsible for the functional changes observed in the 3CYS-TRPV1 construct. A comparison of the outwardly rectifying currents induced by the depolarizing voltage steps to +80 mV in the wild type and in the C616G, C621G, and C634G constructs showed that none of the cysteine mutants exhibited significantly different activation and relaxation kinetics from the wild type at the 0.05 level (one-way analysis of variance). Neither were any significant differences found among the wild-type, C616G, C621G, and C634G constructs in the time constants of tail currents induced by repolarization from +80 to -70 mV. To further substantiate these findings, we quantified the open probability of the wild-type, C621G, and 3CYS mutants from the tail currents plotted against activation voltage (Fig. 1E). These plots were fitted to Boltzmann relationships, and the measured tail current amplitudes were normalized to the estimated maximal current amplitude to obtain the voltage dependence of the open probability. By comparing the averaged data, it seemed that substitution of all three cysteines caused

a shift in the midpoint of voltage activation ($V_{1/2}$) from 64.8 ± 7.2 mV (wild-type TRPV1; $n = 12$) to 95.5 ± 7.5 mV ($n = 13$) in the 3CYS mutant, whereas $V_{1/2}$ was unchanged in C621G (69.7 ± 9.5 mV; $n = 9$; *, $p = 0.686$). These findings indicate that mutating all three extracellular cysteines together results in measurable functional changes in the voltage-induced activation of TRPV1 channel.

Does DTT Act on TRPV1 Channel Molecule Directly? During whole-cell recordings, extracellular application of the membrane-impermeable physiological reducing agent GSH (10 mM) mimicked the effects of 10 mM DTT in potentiating the heat-induced and voltage-induced membrane currents (Fig. 2, A–C). The effects of GSH on the heat-evoked responses seemed weaker than those of DTT, which could be explained by its smaller redox potential (Scott et al., 1963). These data indicate that sulfhydryl groups facing toward the extracellular side of the membrane are indeed involved in regulating the activity of the TRPV1 channel.

That the redox-active substance DTT slightly (but still significantly) potentiates the mutant lacking the three extracellular cysteine residues indicates that DTT may have re-

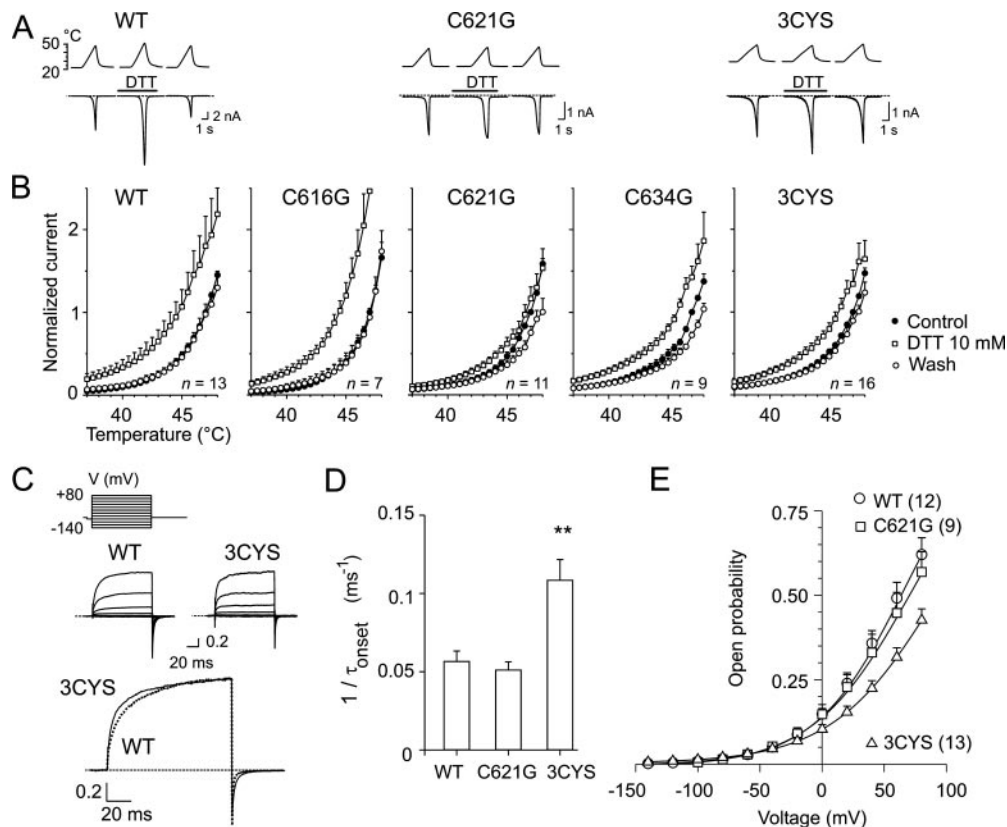


Fig. 1. DTT-induced potentiation of heat-evoked currents reduced in C621G and 3CYS mutants of heterologously expressed rat TRPV1. **A**, representative families of whole-cell currents evoked in wild-type, C621G, and 3CYS mutants by 3-s ramps of heated solutions from 24–48°C in extracellular control solution, in the presence of 10 mM DTT, and recovery 1 min later. Heat-activated currents recovered completely upon washout. Temperatures of superfusing solutions measured by a thermocouple inserted into common outlet capillary of drug application system are indicated above each trace. Dashed lines represent zero current level. Bars above the records indicate duration of drug application. **B**, averaged currents normalized to currents evoked at 47°C in extracellular control solution shown with error bars representing S.E.M. Heat-activated inward currents were induced by 3-s ramps of increasing temperature from 24–48°C. Holding potential, -70 mV. One-way analysis of variance did not reveal significant differences among wild type and mutants in the extent of recovery over the temperature range of 44–47°C (*, $p = 0.399$ at 44°C; *, $p = 0.192$ at 47°C). **C**, effects of mutation of all three extracellularly located cysteines (3CYS; dotted line) on currents elicited by voltage steps (protocol shown, top) in extracellular control solution. Currents were normalized to maximal current produced at +80 mV. **D**, activation rates calculated for WT ($n = 11$), C621G ($n = 7$), and 3CYS ($n = 13$) from activation time constants of current traces elicited at +80 mV. **E**, voltage dependence of open probability of wild-type, C621G, and 3CYS-TRPV1 channels at 24°C. Solid lines are fits with the Boltzmann equation: $V_{1/2} = 64.8$ mV, $z = 0.71$ (wild type); $V_{1/2} = 69.7$ mV, $z = 0.65$ (C621G); and $V_{1/2} = 95.5$ mV, $z = 0.63$ (3CYS). Note shift in $V_{1/2}$ toward more positive potentials in 3CYS mutant.

maining “nonspecific” effects unrelated to thiol-disulfide exchange at TRPV1 (Alliegro, 2000). Previous studies on NR1/NR2A (Choi et al., 2001) and GABA_A (Wilkins and Smart, 2002) receptors demonstrated that the reversible effects of DTT might be caused by the chelation of trace amounts of divalent cations rather than by redox-based mechanisms. We therefore further examined the extent to which 10 mM DTT, applied in the absence of divalent cations, affects the heat-induced currents mediated through wild-type and cysteine-mutated TRPV1 channels. As illustrated in Fig. 3, A and B, the presence of DVF extracellular solution elicited significant inward currents in both wild-type and 3CYS-TRPV1-transfected HEK293T cells at room temperature. In both cases, the extracellular application of 10 mM DTT in DVF solution resulted in a marked potentiation of the heat-induced membrane currents, which indicated that the chelation of divalent cations is not the underlying cause of the remaining DTT-induced potentiation of the heat-evoked membrane currents in TRPV1.

Another mechanism that contributes to the potentiation of heat-induced currents might involve the second messenger pathways associated with protein kinases A, C, or calcium/calmodulin-activated protein kinase II (Humphries et al., 2005). Recent functional studies have identified several serine/threonine residues that are substrates for the direct phosphorylation of TRPV1. Among them, S502 seems to be involved in the potentiation of TRPV1 activity by all three types of kinases (Bhave et al., 2002; Rathee et al., 2002; Jung et al., 2004), and together with another serine, S800, is critically involved in protein kinase C-mediated phosphorylation (Numazaki et al., 2002). To explore the possibility that DTT partially affects some of the protein kinase cascades and thus phosphorylation of TRPV1, we mutated two serine residues, S502 and S800, to alanine and measured the effects of 10 mM DTT on the heat-induced membrane currents. Similarly to wild-type TRPV1, the mutant S502A/S800A was potentiated by the extracellular application of 10 mM DTT as illustrated in Fig. 3C. Together, the results obtained with DTT imply that its dominant effect on the TRPV1 channel is caused by a thiol-disulfide interchange process that involves

the extracellular cysteine residue Cys621. The minor nonspecific effects of DTT do not seem to involve chelation of divalent cations or protein kinase C (and perhaps also PKA or calcium/calmodulin-activated protein kinase II) signaling pathways.

Thiol Alkylating Agent *N*-Ethylmaleimide Modulates TRPV1 Channel in a Manner That Depends on the Preceding Treatment with DTT. To further substantiate the notion that the actions of reducing agents are mediated through the modulation of redox-sensitive site(s) and not by some other nonredox-related mechanism, we used the irreversible thiol alkylating agent NEM. NEM forms covalent bonds with cysteine residues and therefore should prevent further chemical oxidation or reduction of these sites. In the first series of experiments, illustrated in Fig. 4, A and B, HEK293T cells expressing wild-type TRPV1 were stimulated with superfusing extracellular solution heated up to 48°C before, during, and 1 to 2 min after a 40-s application of 1 mM NEM. We found that the amplitude and temperature course of the heat-evoked currents were markedly reduced in the presence of NEM and that the threshold for heat activation was shifted toward lower temperatures (less than ~30°C). The NEM-induced changes were irreversible after >3 min of washout and not reversed by DTT as expected for an alkylation of thiol groups.

In a separate set of experiments, we sought to generate the maximum number of free sulfhydryl groups that can be alkylated with NEM. Cells were therefore initially exposed to 10 mM DTT together with 1 mM NEM followed by the application of NEM alone, each for a duration of 15 s. We were unable to increase either exposure time or NEM concentration without causing cell damage. In contrast to the results obtained in the experiments shown in Fig. 4A, NEM markedly increased the amplitude of the heat-evoked currents, whereas the slope of the temperature-response relationship remained unaltered. Unexpectedly, NEM-treated cells were substantially more susceptible to the subsequent application of DTT compared with the effects of DTT before the addition of NEM (Fig. 4C). The threshold for heat activation was shifted toward lower temperatures (less than ~30°C; Fig.

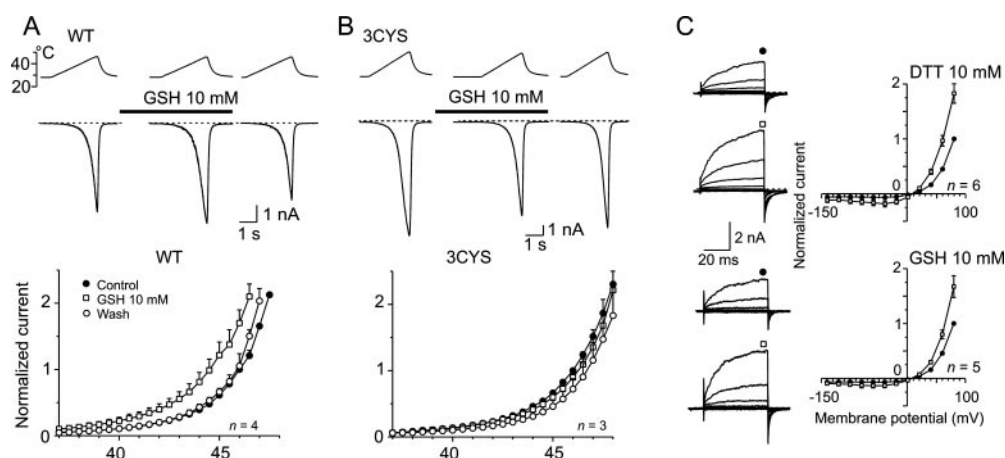


Fig. 2. Reducing agent GSH mimics effects of DTT. A, GSH-potentiated whole-cell currents evoked by temperature ramps (final temperature, 46–48°C) in wild-type TRPV1. Current values normalized to currents evoked at 46°C in extracellular control solution. Averaged currents shown with error bars representing S.E.M. B, GSH failed to affect 3CYS mutant. Averaged currents from three 3CYS-TRPV1-transfected HEK293T cells exposed to GSH normalized with respect to control response evoked at 46°C. C, effects of DTT and GSH on currents elicited by voltage steps in wild-type TRPV1 (protocol as in Fig. 1C; holding potential, -70 mV; voltage steps from -140 to +80 mV, increments 20 mV). Current-voltage relationships constructed from steady-state currents obtained in control conditions (closed symbols) and in the presence of DTT or GSH (open symbols).

4D) in the presence of DTT, and this effect was irreversible after >3 min of washout. NEM and DTT further increased the heat-evoked responses, although less effectively than before.

Together, the data strongly suggest that NEM specifically reacts with free sulfhydryl groups, which, in a manner that depends on the preceding treatment with DTT, results in irreversible changes in the gating of the TRPV1 channel. NEM is an alkylating agent of lower molecular mass and

with substantial membrane permeability; it thus seems highly probable that the TRPV1 receptor is modified on the intracellular side. Regardless, the irreversible shift in the activation threshold indicates that the increased channel activity and susceptibility to DTT may result from allosteric and/or conformational changes in TRPV1 induced by NEM.

Oxidizing Agent Diamide Irreversibly Sensitizes TRPV1-Mediated Membrane Currents Induced by Voltage and Noxious Heat. Diamide is a small thiol oxi-

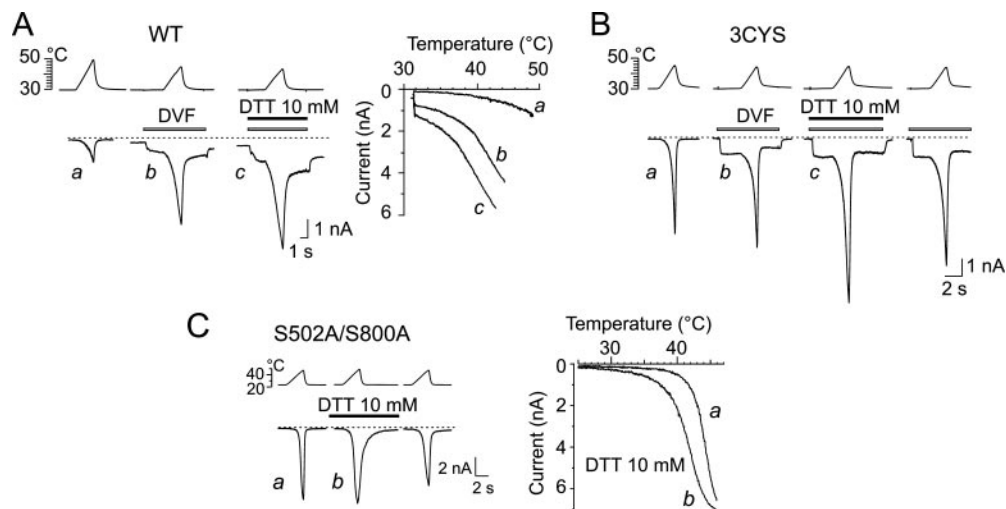


Fig. 3. Effects of DTT do not seem to involve chelation of divalent cations or protein kinase signaling pathways. A, left, WT-TRPV1 channels activated by ramps of heated solutions in extracellular control solution (a), in the presence of DVF extracellular solution (b), and during 8-s exposure to 10 mM DTT in DVF solution (c). The presence of DTT resulted in a potentiation of heat-induced membrane currents. Right, current-temperature plot for currents shown in the left panel. B, effect of DTT in DVF extracellular solution on heat-evoked responses in HEK293T cell expressing 3CYS-TRPV1. C, left, representative traces of DTT-induced increase of heat-activated currents in transfected HEK293T cells expressing double mutant S502A/S800A. Right, temperature-response profiles of heat-activated currents obtained from traces a and b. The traces shown in A, B, and C are representative of three to five similar experiments.

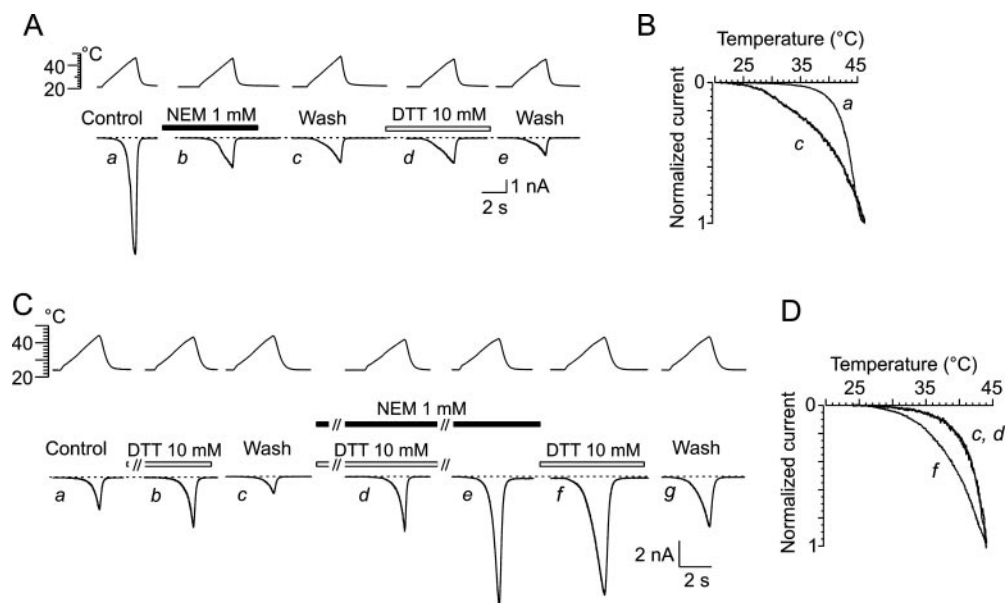


Fig. 4. Thiol-alkylating reagent NEM (1 mM) irreversibly and state dependently modifies heat-induced currents in HEK293T cells expressing WT-TRPV1 channels. A, TRPV1 channels activated by superfusing extracellular solution heated up to 48°C before (a), during (b), and 3 min after 40-s application of NEM (c). DTT (10 mM applied for 30 s) exerted no effect when applied ~2 min after NEM washout. Holding potential, -70 mV. B, current-temperature plot for currents, shown in A, before (a) and after (c) 1 mM NEM treatment. Amplitudes normalized to maximal response obtained at 46°C. C, representative traces of heat-induced responses in TRPV1-expressing HEK cell in control extracellular solution (a), during application of DTT (10 mM) (b), and wash (c), subsequently exposed to DTT together with NEM (1 mM) (d) followed by application of NEM alone (e), each for duration of 15 s. Effects of 10 mM DTT (f) and wash (g) 1 min later. D, current-temperature plot for currents shown in C, recorded in extracellular control solution (c), in the presence of 1 mM NEM together with 10 mM DTT (d), and in the presence of DTT applied after NEM (f). Amplitudes were normalized to maximal response obtained at 44°C. Similar results were obtained in five independent experiments for each type of application protocol.

dant that has been shown to rapidly react with GSH, oxidizing it to glutathione disulfide (Kosower and Kosower, 1995). It can cross the membrane readily by diffusion and perturbs the redox balance of cells by oxidizing intracellular GSH. To study the effects of diamide on the heat-dependent and voltage-dependent mode of TRPV1 activation, either inward currents were induced by 3-s ramps of increasing temperature from 24–48°C, or outward currents were elicited with depolarizing voltage steps (60-ms duration; from –140 to +80 mV in 20-mV increments) in control solution and in the presence of 1 mM diamide. The cells were then washed with bath solution for 1 min, and the reversibility of the observed effects was determined (Fig. 5). A short application of diamide (<10 s) was sufficient to induce marked alterations in the TRPV1-mediated currents: diamide produced a shift in the threshold of the heat-evoked responses to lower temperatures (Fig. 5B) and increased the onset rate (from 16.7 ± 2.6 to 9.8 ± 1.4 ms) and the maximum amplitude of outward currents at +80 mV (2.9 ± 0.5 -fold; $n = 4$; Fig. 5C). The effects of diamide were partially reversed by the application of 10 mM DTT for a period of 1 min (data not shown). Frequently, significant (0.4 ± 0.2 nA; $n = 5$), slowly rising, and irreversible inward currents developed upon 8- to 10-s application of 1 mM diamide at room temperature. The heat-induced currents through the 3CYS-TRPV1, C616G, C621G, and C634G mutant channels were sensitized by diamide to a similar extent to the wild type (Fig. 5D), indicating that neither of the three extracellular cysteine residues are involved in diamide-induced sensitization.

Effects of Oxidizing Agent Cu:Phe on TRPV1-Mediated Heat-Induced Currents. We have previously reported that the oxidizing reagent Cu:Phe (100:400 μ M)

blocks membrane currents induced by noxious heat in native and recombinant TRPV1 channels (Tousova et al., 2004). Although the amplitudes of the heat-evoked responses substantially recovered after Cu:Phe blockage by washing the cells for 1 min in extracellular control solution, a more detailed quantitative reexamination of the recovered heat-evoked currents indicated that after the application of Cu:Phe (8 s), the threshold for heat activation was frequently shifted to lower temperatures in the triple mutant 3CYS (Fig. 6A). Moreover, subsequent extracellular application of 10 mM DTT (twice for 8 s) restored the threshold for heat activation (Fig. 6B). These data provide additional evidence that membrane-permeable oxidizing agents can modulate the thermal sensitivity of TRPV1 channel, probably from the intracellular side.

Chloramine-T Irreversibly Sensitizes TRPV1-Mediated Membrane Currents Induced by Noxious Heat. To further elucidate the mechanisms underlying the modulation of TRPV1 by oxidizing agents, we explored the effects of chloramine-T (Ch-T) on the TRPV1-mediated, heat-evoked currents. Ch-T is an oxidizing agent that, apart from cysteines, preferentially oxidizes methionine to methionine sulfoxide (Vogt, 1995; Schlieff et al., 1996). Thus, other possible targets for redox modulation are the methionine residues in TRPV1, of which Met644, a critical residue for TRPV1 channel permeability (Garcia-Martinez et al., 2000; Ferrer-Montiel et al., 2004) located at the center of a putative selectivity filter, seems to be the most exposed to the extracellular environment. The responses induced by 3-s ramps of increasing temperature from 24–48°C in wild-type TRPV1 were markedly and irreversibly sensitized by the presence of 1 mM Ch-T (Fig. 7, A–D). Ch-T irreversibly sensitized the heat-

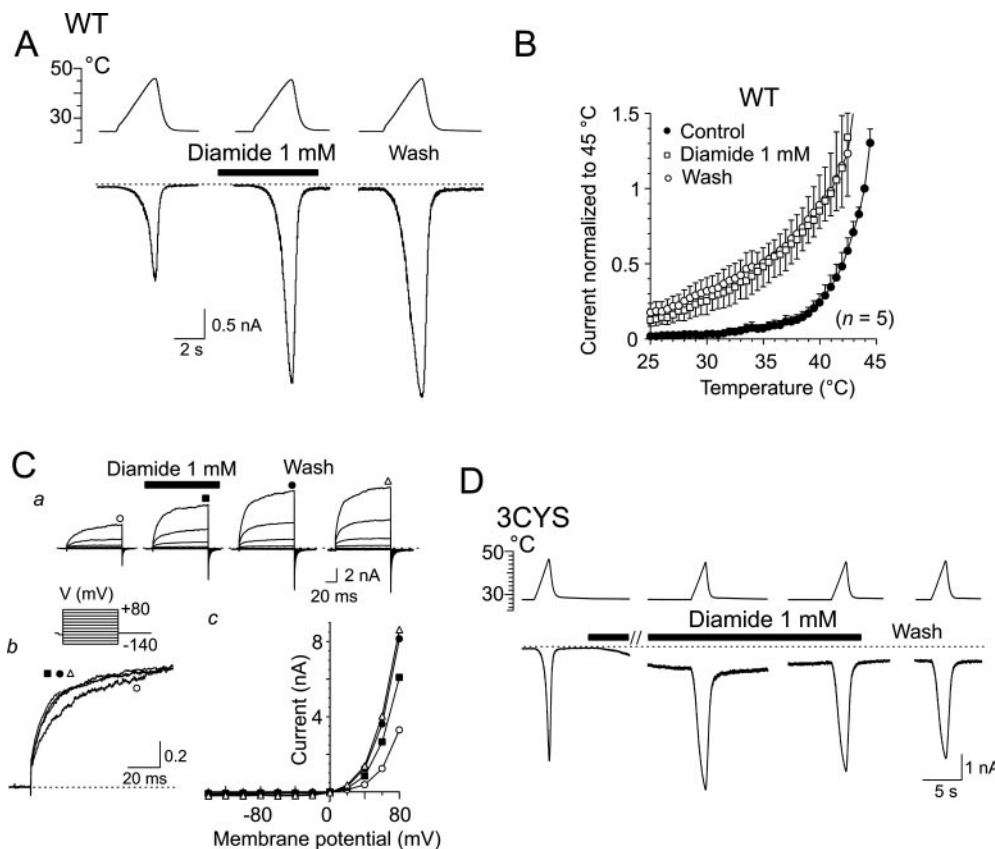


Fig. 5. Oxidizing agent diamide irreversibly potentiates TRPV1-mediated heat-induced membrane currents. **A**, effect of diamide on heat-evoked responses in HEK293T cell expressing WT-TRPV1. Temperature protocol shown above. Dashed lines indicate zero membrane current in all records. **B**, summary of effects of diamide on heat-evoked currents in five HEK293T cells expressing wild-type TRPV1. Currents normalized to current obtained at 45°C before application of diamide, and normalized values represent means \pm S.E.M. **C**, effect of 1 mM diamide on currents elicited by voltage steps (protocol shown in **b**, inset). **b**, time course of onset of current traces, shown in **a**, elicited at +80 mV before (\circ), in the presence of diamide (\blacksquare) and 1 (\bullet) and 2 min (\triangle) after washing out diamide. Currents were normalized to maximal current produced at +80 mV. **c**, instantaneous current-voltage plots of recordings shown in **a** measured at the end of each pulse to +80 mV. **D**, representative heat-induced responses recorded from HEK293T cell transiently transfected with 3CYS mutant of TRPV1. Similar results obtained in five cells. Exposure of cell to diamide resulted in increase in resting membrane current in this cell.

induced currents through 3CYS and M644A mutant channels to a similar extent to the wild type, indicating that neither of the three extracellular cysteine residues nor methionine at position 644 is involved in the Ch-T-induced sensitization of TRPV1. Similar to the effects of diamide, significant inward currents developed in most of the cells examined upon an 8- to 10-s application of 1 mM Ch-T at room temperature (182 ± 80 pA, $n = 9$; 314 ± 74 pA, $n = 5$; and 190 ± 70 pA, $n = 5$ for WT, 3CYS, and M644A, respectively). These currents had a slow onset ($\tau \sim 2$ s) and were irreversible over the time of recording, consistent with the hypothesis that Ch-T has to cross the plasma membrane before reaching the target of its activity. After several heat applications, the Ch-T-induced currents frequently developed into a deteriorating membrane leak.

Effects of Sulfhydryl-Specific Oxidizing Agents Hydrogen Peroxide and DTNB on TRPV1-Mediated Heat-Induced Currents. To explore further to what extent the effects of oxidizing agents are specific to cysteines, we used the cysteine-selective oxidants H_2O_2 and DTNB (0.5 mM) and tested their effects on the heat-induced membrane currents mediated by wild-type TRPV1 channels (Fig. 8). The membrane currents evoked by heat were potentiated by 10 mM H_2O_2 (by 28% at 45°C). Notably, this potentiation was

fully reversed within 50 s. In this respect, the potentiating effect of H_2O_2 was qualitatively different from that of other oxidizing agents (Fig. 8, A and B). The membrane-impermeable oxidant DTNB was completely ineffective (Fig. 8, C and D) in all cells tested ($n = 6$), which suggests that surface-exposed cysteine residues either do not contribute to TRPV1 modulation by oxidizing agents or are closer to the fully oxidized than the fully reduced state under steady-state conditions. In contrast, H_2O_2 is freely membrane permeant and the sulfhydryl groups available to react with H_2O_2 include both hydrophilic and hydrophobic sites. Thus, these data suggest that H_2O_2 can interact with sulfhydryl groups distinct from those exposed to the surface.

Concentration of Capsaicin Reduced in the Presence of Oxidizing Compounds. The sulfhydryl-oxidizing agents Hg^{2+} , DTNB, GSSH, H_2O_2 , and thimerosal have been reported to reduce the capsaicin-evoked currents in TRPV1-transfected HEK293T cells (Jin et al., 2004). Consistent with these findings, we found that the coapplication of capsaicin (1 μ M) and Ch-T (1 mM) reversibly inhibited the capsaicin-evoked responses in wild-type TRPV1 at room temperature (by $95 \pm 4\%$; $n = 5$; Fig. 9A). However, we subsequently found that Ch-T equally inhibits the capsaicin-evoked currents in the TRPV1 mutant lacking extracellular cysteines,

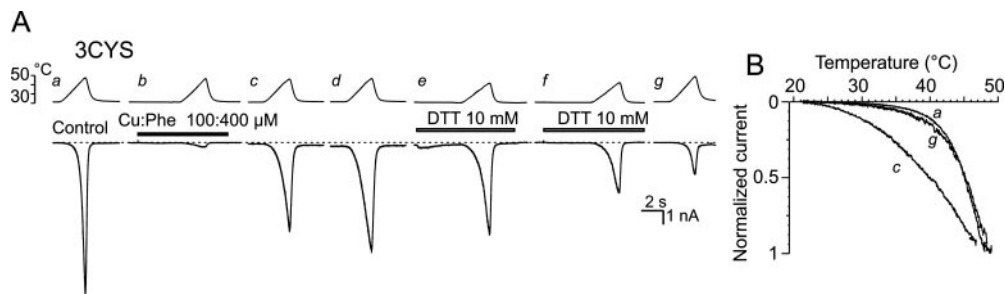


Fig. 6. Oxidizing agent Cu:Phe irreversibly reduces threshold for heat activation of TRPV1. A, representative effects of Cu:Phe and DTT on heat-evoked currents obtained from 3CYS-TRPV1-transfected HEK cell in extracellular control solution (a), in the presence of Cu:Phe (b), upon wash (c and d), followed by two applications of 10 mM DTT (e and f), and after 30-s washing with control extracellular solution (g). Holding potential, -70 mV. Data are representative traces, typical of $n = 7$. B, superimposed current-temperature plots for responses shown in A, recorded in extracellular control solution (a), after Cu:Phe (c), and after DTT (g). Currents normalized to the maximal response obtained at 48°C.

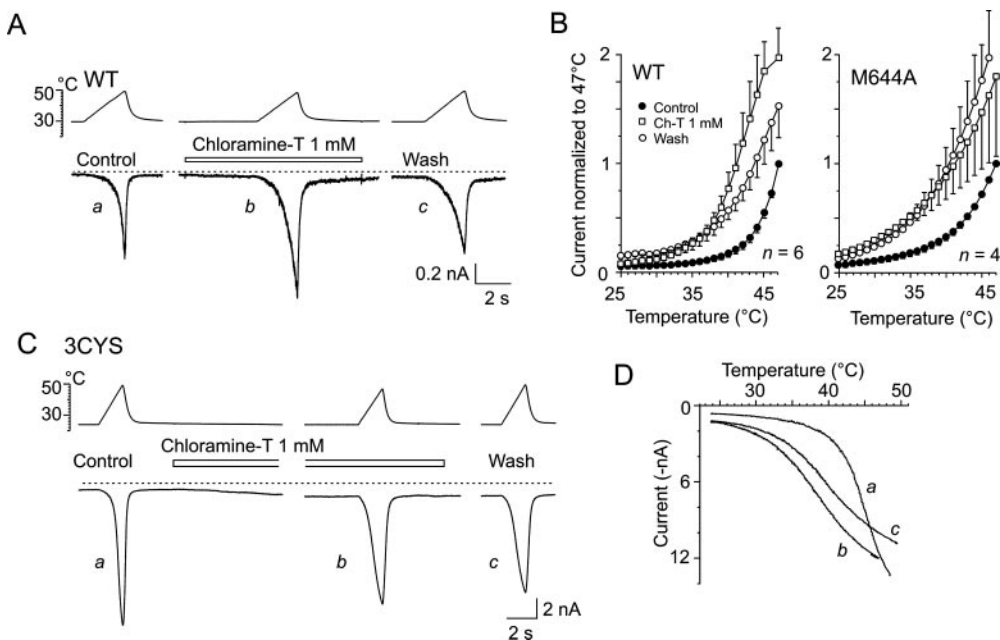


Fig. 7. Ch-T irreversibly reduces threshold for heat activation of TRPV1. A and C, representative traces of heat-induced responses obtained from WT-TRPV1-transfected and 3CYS-TRPV1-transfected HEK293T cells in extracellular control solution (a), in the presence of 1 mM Ch-T (b), followed by 30-s washing with extracellular control solution (c). B, summary of effects of Ch-T on heat-evoked currents in six HEK293T cells expressing wild-type TRPV1 and in four cells expressing M644A mutant. Currents normalized to current obtained at 47°C before application of Ch-T, and normalized values represent means \pm S.E.M. D, superimposed current-temperature plots for responses shown in C recorded in 3CYS mutant in extracellular control solution (a), in the presence of Ch-T (b), and upon wash (c).

3CYS (Fig. 9B). Moreover, since Ch-T is known to oxidize both cysteine and methionine residues, we evaluated the effects of this oxidizing agent on the mutant TRPV1-M644A and found that the capsaicin-evoked responses were again inhibited to the same extent as in the wild type (Fig. 9C). To a lesser degree (by $50 \pm 15\%$; $n = 5$), Ch-T also inhibited the inward currents induced by $100 \mu\text{M}$ 2-aminoethoxydiphenyl borate (data not shown), a compound that is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels (Hu et al., 2004).

These observations led us to suspect that the effects of oxidizing agents on capsaicin-evoked currents did not reflect the thiol-disulfide exchange at TRPV1 since the above-men-

tioned effects were determined by coapplication with capsaicin. Based on the results from the study of Jin et al. (2004) mentioned above, in which an extracellular cysteine at position 621 has been identified as the site for redox modulation, we next examined the effects of diamide on the capsaicin-induced currents in the C621G mutant of TRPV1. Also, the coapplication of 1 mM diamide on this construct reversibly inhibited the currents evoked by $1 \mu\text{M}$ capsaicin over the temperature range $23\text{--}48^\circ\text{C}$ as illustrated in Fig. 9D. Therefore, we were interested to learn whether the oxidizers might influence the effective concentrations of capsaicin in general. Chromatographic separation of the equilibrium mixture of $1 \mu\text{M}$ capsaicin and 1 mM diamide or 1 mM chloramine-T on an

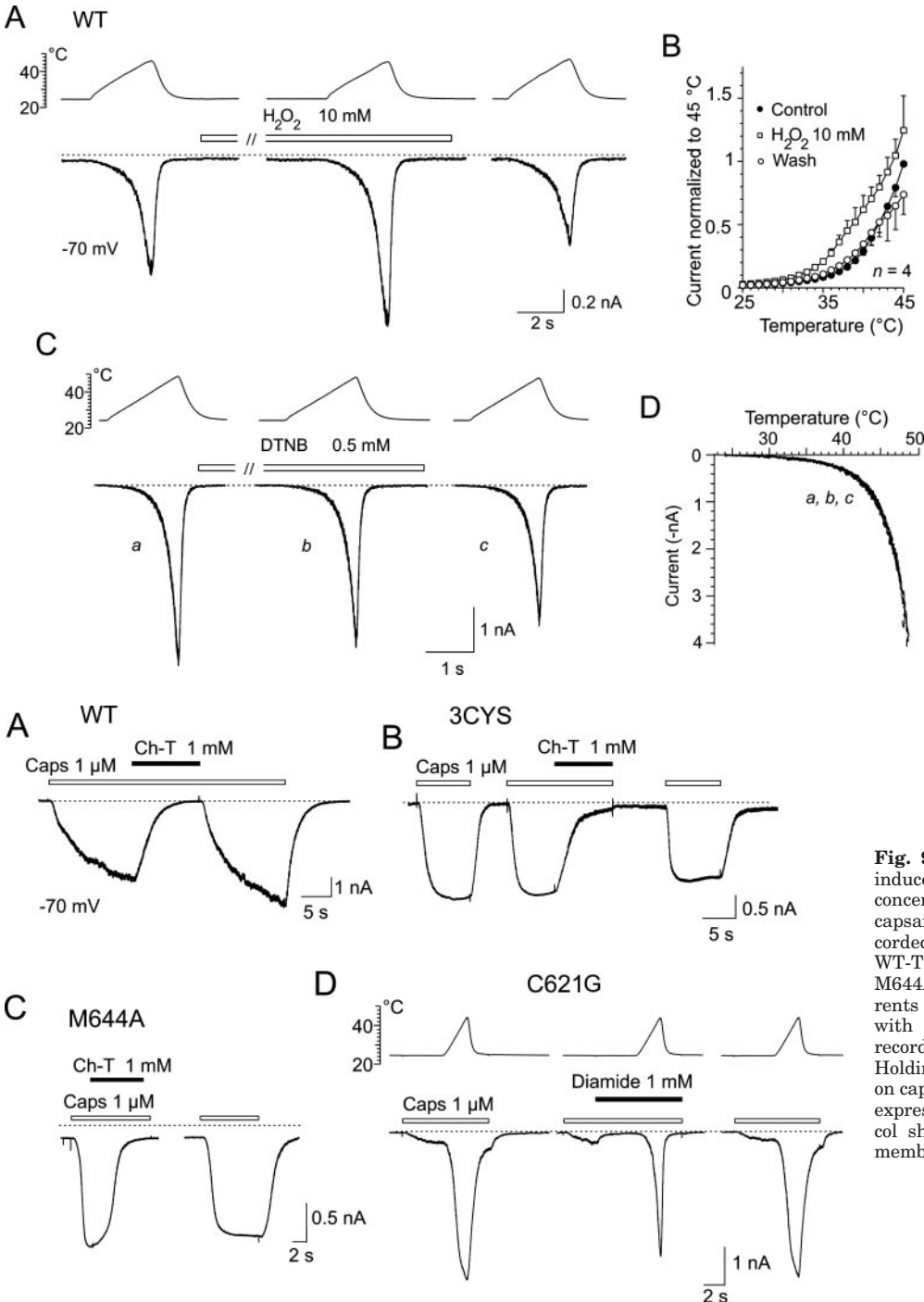


Fig. 8. Effects of hydrogen peroxide and DTNB on TRPV1-mediated heat-induced currents. A, representative traces showing whole-cell patch-clamp recordings from HEK293T cell transiently transfected with wild-type TRPV1. Bar above the records indicate 40-s period of drug application. Holding potential, -70 mV . B, summary of effects of H_2O_2 on heat-evoked currents derived from four cells expressing WT-TRPV1. Currents normalized to current obtained at 45°C before application of H_2O_2 , and normalized values represent means \pm S.E.M. C, membrane-impermeable, cysteine-specific oxidizing agent DTNB had no effect on TRPV1-mediated heat-evoked currents. D, superimposed current-temperature plots for responses shown in C, recorded in extracellular control solution (a), in the presence of DTNB (b), and 1 min after washing out DTNB reagent (c).

Fig. 9. Oxidizing agents influence capsaicin-induced activity of TRPV1 by decreasing its concentration. A to C, representative traces of capsaicin-induced whole-cell responses recorded from HEK293T cell transfected with WT-TRPV1, 3CYS-TRPV1 mutant, and M644A-TRPV1 mutant. Capsaicin-induced currents abolished by coapplication of capsaicin with 1 mM chloramine-T. Capsaicin-induced currents abolished by coapplication of capsaicin with 1 mM chloramine-T. Holding potential, -70 mV . D, effect of diamide on capsaicin-evoked responses in HEK293T cell expressing C621G-TRPV1. Temperature protocol shown above. Dashed lines indicate zero membrane current in all records in this figure.

HPLC-mass spectrometer system revealed that the capsaicin concentration decreased by 35% in the presence of diamide, and, in the case of chloramine-T, it was below the detection level of the system. These data strongly suggest that the effects of oxidizing agents on capsaicin-activated TRPV1 channels are caused by a reduction in the concentration of capsaicin rather than by a redox-based mechanism.

Discussion

In this study, we demonstrate that the chemical modification of TRPV1 by both reducing and oxidizing agents leads to an increased response to heat and involves both extracellular and intracellular mechanisms. In addition, we show that the extracellularly located cysteine at position 621 contributes to the DTT-induced potentiation of heat-activated ionic currents mediated by TRPV1. On the intracellular side, the heat-induced activity of TRPV1 is modulated by the membrane-permeable oxidizing agents diamide, Cu:Phe, and chloramine-T.

Potentiation of TRPV1 Channel by Reducing Agents. The tetrameric TRPV1 channel possesses 18 cysteine and 20 methionine residues in each subunit. Of these residues, three cysteines (Cys616, Cys621, and Cys634) and three methionines (Met541, Met609, and Met644) can theoretically undergo reduction or oxidation on the extracellular side of the plasma membrane. Additional state-dependent sites of redox modulation may be represented by the methionine residues located at pore-lining segments S5 (Met581) and S6 (Met677 and Met682), but in this case, further studies may actually be complicated by mutations within this critical region frequently giving rise to nonfunctional channels (Kuzhikan-dathil et al., 2001).

In our present study, the mutation of the three extracellular cysteines (3CYS) fully abrogated the effects of the membrane-impermeable reducing agent GSH (10 mM) on heat-evoked responses. However, the 3CYS mutation did not fully abolish the potentiating effects induced by DTT, a compound that readily permeates cell membranes (Lauriault and O'Brien, 1991). We excluded the possibility that some effects of DTT on 3CYS might be caused by chelation of trace amounts of divalent cations and we also made an attempt to exclude the involvement of protein kinase activation by DTT. The prevailing view is that, on the cytoplasmic side, high concentrations of the most abundant thiol GSH (above 10 mM in neuronal cells; Slivka et al., 1987) keep proteins in the reduced state. Therefore, one would expect that DTT, once passed through the cell membrane, should not affect protein sulfhydryls on the intracellular side. The remaining sensitivity of 3CYS to DTT observed in our experiments could thus be unrelated to thiol-disulfide exchange (Alliegro, 2000).

Modulation of TRPV1 by Oxidizing Agents. Whereas extracellular Cys621 seems to be essential for the redox-mediated modulation of TRPV1, the precise structural components that contribute to this type of modulation on the intracellular side remain to be identified. Our results demonstrate that oxidizing compounds such as diamide, Cu:Phe, chloramine-T, and H₂O₂ strongly potentiate the heat-evoked activity of TRPV1. The 3CYS mutation did not influence the effects of membrane-permeable diamide, Cu:Phe, or Ch-T, whereas the membrane-impermeable cysteine-specific oxidizing agent DTNB had no effect on wild-type TRPV1-medi-

ated heat-induced currents. These results together strongly suggest that there are no oxidizable residues exposed to the surface that may contribute to TRPV1 function. We cannot rule out that the effects of the membrane-permeable oxidizing agents might be a result of alterations in the activity of a protein putatively associated with TRPV1 or the involvement of second messenger signaling cascades. However, in the present study, we demonstrate that there are state-dependent irreversible changes in TRPV1 functionality after NEM treatment. We found that a 40-s application of NEM, an alkylating agent, rendered TRPV1 channel insensitive to subsequent DTT modulation. In contrast, TRPV1-mediated heat-evoked responses were strongly sensitized by DTT following the coapplication of NEM and DTT (Fig. 4). Thus, thiol-reactive agents seem to modulate the gating of TRPV1 channels by an action directly on the TRPV1 protein or associated protein.

Redox-Active Substances Reduce Effective Concentration of Capsaicin. In this study, we examined the effects of redox-active substances on the heat-induced membrane currents, because increasing the temperature above ~42°C activates the channels directly (Tominaga et al., 1998). This experimental approach has the advantage that no ligand binding to the receptor is needed to gate the channels; thus, potential ambiguities arising from direct modification of the ligand molecule by redox-active substances can be avoided. That ligands themselves can be modified by redox reagents should be taken into consideration when defining the role of endogenous reducing and oxidizing agents on TRPV1 functionality. Our data indicate that capsaicin concentration is radically altered by the presence of oxidizing agents. More generally, the redox-active substances can substantially affect the activity of TRPV1 channels by influencing their modulators or coactivators.

Thermal Threshold for TRPV1 Activation Depends on Cellular Redox State. It is widely thought that disulfide bonds have been added during evolution to enhance the thermal stability of those proteins that play their biological roles in an oxidizing extracellular environment. The formation of disulfide bonds, however, does not necessarily lead to enhanced protein stability. On the contrary, a decreased thermodynamic stability has been observed in some of the proteins in which novel disulfides have been introduced (Matsumura et al., 1989; Betz, 1993; Petersen et al., 1999). That both reducing and oxidizing conditions lead to a shift in the temperature activation threshold toward cooler temperatures in TRPV1 channels suggests that their functionality may require an optimal redox state. This is consistent with the hypothesis that the thiol redox state may serve as a critical tuner for the thermal threshold of TRPV1 ion channels and thus sensory neurons.

In spite of the uncertainties in our present knowledge concerning the specific molecular mechanisms involved, it seems likely that changes in the redox state of TRPV1 channels could play an important role in the pathogenesis of acute or chronic pain states. We demonstrate that in the presence of redox compounds, the temperature threshold for TRPV1 activation is substantially reduced such that normal body temperature is capable of activating TRPV1. Therefore, disturbances in the redox state in peripheral tissues under a variety of pathophysiological conditions, including tissue damage, metabolic stress, ischemia, and inflammation, may

contribute directly to regulating activity of TRPV1 channel and thus to nociceptor sensitization. A potential physiological role for redox agents in the modulation of pain sensation has also been recently proposed by Todorovic et al. (Todorovic et al., 2001; Nelson et al., 2005). Their results provide evidence that redox agents selectively modulate T-type Ca^{2+} channels in rat peripheral nociceptors, whereas the currents through other voltage-gated (Na^+ , K^+ , high-voltage-activated, or Ca^{2+}) and ligand-gated channels (capsaicin, low pH, or ATP) are not influenced. Although these authors indicate that DTT is ineffective in modulating capsaicin-gated and heat-gated currents in sensory neurones even at severalfold higher concentrations than those affecting T-type Ca^{2+} channels, in the present report, we demonstrate that redox-active substances regulate the heat-induced activity of recombinant TRPV1 receptor channels. The changes induced by membrane-permeable oxidizing agents are irreversible and robust enough to significantly lower the threshold for heat activation.

Structural Implications of Our Findings. Our studies using various sulfhydryl reagents may help to clarify the multiple mechanisms involved in the modulation of TRPV1 by changes in redox potential. By using the alkylating agent NEM, we demonstrated that the threshold for heat activation can be irreversibly modified when NEM is concurrently applied with DTT during heat stimulation. This is consistent with the possibility that the target residues of the redox modulation lie directly within the TRPV1 receptor channel protein and undergo state-dependent changes in accessibility (Fig. 4). Recently, structural information on the architecture of numerous channels has been gathered by substituted cysteine scanning mutagenesis studies (for review, see Karlin and Akabas, 1998). Thus, precise knowledge of the properties of endogenous cysteines is essential.

To obtain a more complete picture of the molecular basis of redox modulation, we submitted the TRPV1 protein amino acid sequence from V596 to D654 to the predictive software program DiANNA (DiAminoacid Neural Network Application) that incorporates a neural network-based predictor trained to distinguish the bonding states of cysteine in proteins (Ferre and Clote, 2005). The results from the cysteine oxidation state prediction module yielded a half-cystine for Cys621, which was in agreement with our observation that Cys621 is involved in the modulation of the TRPV1 channel by extracellular DTT. Based on this prediction software, it is also likely that there are no intramolecular disulfide bonds within the TRPV1 receptor protein. The process of reduction and oxidation of Cys621, therefore, may involve an interaction of two adjacent TRPV1 subunits. Of 13 cysteine residues in the cytoplasmic N-terminal (10) and C-terminal regions (three) of TRPV1, two are predicted to be oxidized at the N-tail outside of the ankyrin repeat domain (Cys21 and Cys63). It can be imagined that these intracellular cysteines can participate in the formation of interior intramolecular disulfide cross-links, similar to those reported for homotetrameric cyclic nucleotide-gated channels (Gordon et al., 1997) and voltage-gated Shaker potassium channels (Schulze et al., 1996).

Earlier radioligand binding studies (Szallasi et al., 1993) showed that reducing and oxidizing agents diminish both the positive cooperativity and apparent binding affinity of [^3H]resiniferatoxin to the vanilloid receptor. Our present

findings extend these results to the temperature-dependent mode of TRPV1 activation and support the interpretation that cooperation between TRPV1 subunits may be, at least in part, subject to redox modulation.

Conclusions

In summary, our results provide evidence that at least some of the actions of the redox-active substances are likely to be mediated by the reduction or oxidation of specific sites on the TRPV1 channel molecule. This specific oxidation and chemical reduction may have substantial consequences for TRPV1 channel functionality and may constitute a mechanism for the regulation of TRPV1 activity under both physiological and pathological conditions.

Acknowledgments

We thank Dr. I. Miksik for HPLC analysis.

References

- Allegro MC (2000) Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Anal Biochem* **282**:102–106.
- Betz SF (1993) Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Sci* **2**:1551–1558.
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, and Gereau RW 4th (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* **35**:721–731.
- Boersch A, Callingham BA, Lembeck F, and Sharman DF (1991) Enzymic oxidation of capsaicin. *Biochem Pharmacol* **41**:1863–1869.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature (Lond)* **389**:816–824.
- Choi Y, Chen HV, and Lipton SA (2001) Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn^{2+} modulation of the NMDA receptor. *J Neurosci* **21**:392–400.
- Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, and Vlachova V (2006) Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* **151**:178–185.
- Ferre F and Clote P (2005) DiANNA: a Web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res* **33**:W230–W232.
- Ferrer-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, and Planells-Cases R (2004) Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* **271**:1820–1826.
- Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, and Ferrer-Montiel A (2000) Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem* **275**:32552–32558.
- Gordon SE, Varnum MD, and Zagotta WN (1997) Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **19**:431–441.
- Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, and Zhu MX (2004) 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2 and TRPV3. *J Biol Chem* **279**:35741–35748.
- Humphries KM, Deal MS, and Taylor SS (2005) Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *J Biol Chem* **280**:2750–2758.
- Jin Y, Kim DK, Khil LY, Oh U, Kim J, and Kwak J (2004) Thimerosal decreases TRPV1 activity by oxidation of extracellular sulfhydryl residues. *Neurosci Lett* **369**:250–255.
- Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, and Oh U (2004) Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* **279**:7048–7054.
- Karlin A and Akabas MH (1998) Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol* **293**:123–145.
- Kosower NS and Kosower EM (1995) Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol* **251**:123–133.
- Kuzhikandathil EV, Wang H, Szabo T, Morozova N, Blumberg PM, and Oxford GS (2001) Functional analysis of capsaicin receptor (vanilloid receptor subtype 1) multimerization and agonist responsiveness using a dominant negative mutation. *J Neurosci* **21**:8697–8706.
- Lauriault VV and O'Brien PJ (1991) Molecular mechanism for prevention of *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine cytotoxicity by the permeable thiol drugs diethylthiocarbamate and dithiothreitol. *Mol Pharmacol* **40**:125–134.
- Matsumura M, Becktel WJ, Levitt M, and Matthews BW (1989) Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:6562–6566.
- Nelson MT, Joksovic PM, Perez-Reyes E, and Todorovic SM (2005) The endogenous redox agent L-cysteine induces T-type Ca^{2+} channel-dependent sensitization of a novel subpopulation of rat peripheral nociceptors. *J Neurosci* **25**:8766–8775.
- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, and Voets T (2005) Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol (Lond)* **567**:35–44.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, and Tominaga M (2002) Direct phosphory-

- lation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* **277**:13375–13378.
- Petersen MT, Jonson PH, and Petersen SB (1999) Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins. *Protein Eng* **12**:535–548.
- Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Morenilla-Palao C, and Ferrer-Montiel (2005) A Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflug Arch Eur J Physiol* **451**:151–159.
- Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, and Kress M (2002) PKA/AKAP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci* **22**:4740–4745.
- Scott EM, Duncan IW, and Ekstrand V (1963) Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *J Biol Chem* **238**:3928–3933.
- Schlieff T, Schonherr R, and Heinemann SH (1996) Modification of C-type inactivating Shaker potassium channels by chloramine-T. *Pflug Arch Eur J Physiol* **431**:483–493.
- Schulteis CT, Nagaya N, and Papazian DM (1996) Intersubunit interaction between amino- and carboxyl-terminal cysteine residues in tetrameric shaker K⁺ channels. *Biochemistry* **35**:12133–12140.
- Slivka A, Spina MB, and Cohen G (1987) Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. *Neurosci Lett* **74**:112–118.
- Szallasi A and Blumberg PM (1993) [³H]Resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **347**:84–91.
- Szallasi A, Lewin NA, and Blumberg PM (1993) Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation. *J Pharmacol Exp Ther* **266**:678–683.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C, Olney JW, and Zorumski CF (2001) Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* **31**:75–85.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, and Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**:531–543.
- Tousova K, Susankova K, Teisinger J, Vyklicky L, and Vlachova V (2004) Oxidizing reagent copper-o is an open channel blocker of the vanilloid receptor TRPV1. *Neuropharmacology* **47**:273–285.
- Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Ettrich R, and Vyklicky L (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* **23**:1340–1350.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, and Nilius B (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature (Lond)* **430**:748–754.
- Vogt W (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets and reversal. *Free Radic Biol Med* **18**:93–105.
- Vyklicky L, Lyfenko A, Susankova K, Teisinger J, and Vlachova V (2002) Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience* **111**:435–441.
- Wilkins ME and Smart TG (2002) Redox modulation of GABAA receptors obscured by Zn²⁺ complexation. *Neuropharmacology* **43**:938–944.

Address correspondence to: Dr. Viktorie Vlachova, Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology AS CR, Videnská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. E-mail: vlachova@biomed.cas.cz

Oxidizing reagent copper-*o*-phenanthroline is an open channel blocker of the vanilloid receptor TRPV1

K. Tousova, K. Susankova, J. Teisinger, L. Vyklicky, V. Vlachova*

Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology ASCR, Academy of Sciences, Videnská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

Received 18 September 2003; received in revised form 24 March 2004; accepted 22 April 2004

Abstract

The TRPV1 channel plays an important role in generating nociceptive signals in mammalian primary sensory neurons. It consists of 838 amino acids with six transmembrane segments (TM1–TM6), a pore-forming loop between TM5 and TM6 and N- and C- terminals located intracellularly. It is a homotetramer and forms a nonselective cationic channel that can be opened by capsaicin, weak acids and noxious heat. There are 18 cysteines (Cys), three of which are located on the extracellular side of the receptor in and around the region of the pore-forming loop. We report that the TRPV1 channel in transfected HEK293T cells and in cultured rat DRG neurons is blocked in the open state by an oxidizing agent Cu-*o*-phenanthroline complex (Cu:Phe). The effects of Cu:Phe are concentration dependent ($IC_{50} = 5.2 : 20.8 \mu\text{M}$) and fully reversible. Cu:Phe applied immediately before exposure to an acidic solution, capsaicin or noxious heat is without effect. Substitutions of the extracellular Cys residues (616, 621, 634) by glycine individually or together do not alter the blocking effects of Cu:Phe suggesting that disulfide cross-linking does not represent the underlying mechanism. It is suggested that the complex Cu:Phe, a bulky, positively charged molecule, represents a very effective and reversible open channel blocker of TRPV1.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Vanilloid receptor; Thiol reagents; TRP channels; Redox; Capsaicin; Open-channel block

1. Introduction

The TRPV1 channel plays a role of the polymodal detector of nociceptive stimuli in a subset of small and medium sized primary sensory neurons in mammals. It can be activated by capsaicin, the pungent agent of red peppers (Bevan and Docherty, 1993; Wood and Docherty, 1997), weak acids (Bevan and Yeats, 1991) and noxious heat (Cesare and McNaughton, 1996); all these agents produce burning pain in humans. The molecular structure of TRPV1 was identified by (Caterina et al., 1997) as a protein consisting of 838 amino acids with six transmembrane segments, a pore-forming loop between TM5 and TM6 and with the N- and C- terminals located intracellularly. Apparently four identical subunits form the functional nonselective cation channel

(Jahnel et al., 2001; Kedei et al., 2001; Kuzhikandathil et al., 2001). TRPV1 receptor contains a number of distinct domains from which the channel can be regulated, including several consensus phosphorylation sites for cyclic AMP—dependent protein kinase A (Bhave et al., 2002; Rathee et al., 2002) and Ca^{2+} -independent protein kinase C (Cesare et al., 1999; Cesare and McNaughton, 1996; Numazaki et al., 2002).

TRPV1 contains 18 cysteine residues of which three C616, C621 and C634 are located on the extracellular side of the receptor, in the pore-forming loop and the region flanking it. The finding that the reducing agent dithiothreitol (DTT) robustly increases the responses induced by capsaicin and noxious heat in small DRG neurons and in heterologously expressed TRPV1 (Vyklicky et al., 2002) suggests that the reduced state of sulfhydryl groups of the cysteine residues in TRPV1 underlies the enhancing effects of DTT. On the contrary, oxidation of closely placed cysteine thiols to a disulfide bridge might be an important factor of

* Corresponding author. Tel.: +420-29-644-2711; fax: +420-29-644-2488.

E-mail address: vlachova@biomed.cas.cz (V. Vlachova).

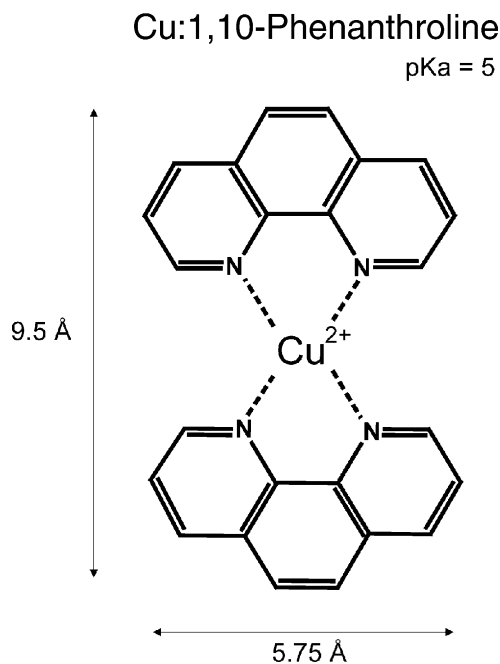


Fig. 1. Chemical structure of Cu(II)-1,10 phenanthroline. Size of the complex molecule (5.75 × 9.5 Å) has been determined from the structure by SwissPdbViewer (Glaxo Welcome Experimental research; Guex and Peitsch, 1997). The molecule of Cu(II)-1,10-phenanthroline contains two positive charges.

physiological relevance for regulating the function of TRPV1.

In this study, we investigated whether the *o*-phenanthroline copper complex (Fig. 1) that is an effective catalyst for the oxidation of the –SH groups of glutathione and cysteine residues at the active sites of several enzymes (Kobashi, 1968) can modify the activity of TRPV1 receptor. We hypothesized that Cu:Phe could change the gating properties of this channel by forming intra- or intersubunit bonds between the sulfhydryl groups of cysteines as has been shown for a number of ion channels in previous studies (Gordon et al., 1997; Rosenbaum and Gordon, 2002; Schulte et al., 1998). We report that Cu:Phe strongly inhibits membrane currents induced by noxious heat, capsaicin and acids and that this effect is not due to the disulfide formation linking extracellularly located cysteines but by blocking the channels in open state.

2. Methods

2.1. Construction of cysteine substitution mutants of TRPV1

The cDNA coding rat TRPV1 was used to create mutants by PCR amplification using rat TRPV1-specific primers synthesized to contain a point mutation

converting the cysteine at positions C616, C621 and C634 to glycine. The QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used according to manufacturer's protocol to perform point mutations in TRPV1. The overlapping primer pairs were as follows: TRPV1-C616, 5'-G TCC ACA CCA CAC AAG **GGC** CGG GGG TCT GCC TGC AAG CC-¹/₃ (sense) and 5'-GCA GGC AGA CCC CCG GCC CTT GTG TGG TGT GGA CTC C-¹/₃ (antisense); TRPV1-C621, 5'-GC CGG GGG TCT GCC **GGC** AAG CCA GGT AAC TCT TAC AAC-¹/₃ (sense) and 5'-GA GTT ACC TGG CTT GCC GGC AGA CCC CCG GCA CTT GTG-¹/₃ (antisense); TRPV1-C634, 5'-C AAC AGC CTG TAT TCC ACA **GGT** CTG GAG CTG TTC AAG TTC-¹/₃ (sense) and 5'-CTT GAA CAG CTC CAG ACC TGT GGA ATA CAG GCT GTT GTA AG-¹/₃ (antisense). Using the TRPV1-C634 as a template, the following primer pair was designed to mutate all the three extracellularly located cysteines: 5'-G TCC ACA CCA CAC AAG **GGC** CGG GGG TCT GCC **GGC** AAG CCA GGT AAC TCT TAC-¹/₃ (sense; 52-mer) and 5'-GTA AGA GTT ACC TGG CTT GCC GGC AGA CCC CCG GCC CTT GTG TGG TGT GGA C-¹/₃ (antisense). Base changes introducing the mutation are in bold-italic. All site-directed mutated constructs were confirmed by DNA sequencing using an automated sequencer (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, USA).

2.2. Cell culture and expression of cDNAs

All experiments were performed in compliance with the European Community's Council Directive and with approval of the Institutional Animal Care and Use Committee. Primary cultures of DRG neurons were prepared from new-born rats (2–4 d) that were killed by decapitation as previously described (Vyklícky et al., 1999). Nerve growth factor (mNGF 7S, Alomone, Israel) (30 ng/ml) was added to the nutrient media. Only small DRG neurons (<20 μm in diameter) were selected for recording. cDNA of rat TRPV1 in pcDNA3 vector (kindly provided by Dr. David Julius, University of California, San Francisco, CA) or cDNA of rat TRPM8 in bicistronic IRES-EGFP vector (kindly provided by Dr. David Julius, University of California, San Francisco, CA and by Elvira de la Peña, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain) were transfected into HEK 293T cells (SD 3515; ATCC, USA) by Lipofectamine2000 (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's protocol. Green fluorescent protein (GFP) in pQBI 25 vector (TaKaRa; Tokyo, Japan) was used for cotransfection with TRPV1 to mark the cells. Twenty-four to forty-

eight hours after transfection, the HEK 293T cells were used for measurements.

2.3. Electrophysiology

Whole cell membrane currents were recorded by means of an Axopatch-1D amplifier, and pCLAMP8 programs (Axon Instruments, USA). Electrodes were pulled from borosilicate glass and had a resistance of 2–4 M Ω after fire polishing and filling. The series resistance was usually less than 10 M Ω and was compensated to ~80%. For drug application, a system for fast superfusion of the neurons was used. It consisted of a manifold of seven fused silica capillaries connected to a common outlet made from a glass capillary around which an isolated copper wire (20 μ m) was coiled to apply a d.c. current for heating (Dittert et al., 1998). The temperature of the superfusing solution was measured by a miniature thermocouple inserted into the outlet capillary near to its orifice. Before and after the test solutions were applied, the cells were superfused with the control extracellular solution (ECS) of the following composition (mM): NaCl, 160; KCl, 2.5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glucose, 10; the pH was adjusted to 7.3 with NaOH. The intracellular pipette solution (ICS) contained (mM): Cs-gluconate, 125; CsCl, 15; EGTA, 5; HEPES, 10; MgATP, 2; NaCl, 2; CaCl₂, 0.5; the pH was adjusted to 7.3 with CsOH. Capsaicin was dissolved in DMSO 100 μ l and diluted with 0.9 ml of distilled water to make a stock solution of 1 mM. The oxidizing reagent, Cu(II)-1,10-phenanthroline, was freshly prepared prior to each experiment and used within 4 h at room temperature. CuSO₄ was solubilized in H₂O (200 mM stock solution) and mixed with 1,10-phenanthroline (Sigma; 200 mM stock solution in ethanol). The final concentrations of copper and 1,10-phenanthroline in the bathing solution were mixed in a molar ratio of 1:4 (CuSO₄:1,10-phenanthroline).

Data are expressed as means \pm S.E.M. For statistical comparisons, Student's *t*-tests or the ANOVA and Dunnett's test were performed where appropriate. Significant differences were accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of Cu-o-phenanthroline on heat-induced membrane currents in wild type TRPV1 expressed in 293T cells

In HEK 293T cells transfected with wild type TRPV1, capsaicin, acid pH and noxious heat-induced membrane currents similar to those observed in small and medium size cultured DRG neurons isolated from mammals (Caterina et al., 1997; Tominaga et al.,

1998). We tested the effects of extracellular application of Cu:Phe (100:400 μ M) on the membrane currents induced by 3 s heat ramps which increased the temperature to 47 $^{\circ}$ C (I_{HEAT}) (Fig. 2). We found that Cu:Phe (100:400 μ M) produced a profound inhibition of I_{HEAT} to $19.2 \pm 4.6\%$ ($n = 8$). The control response to a 3 s ramp of increasing temperature produced a typical I_{HEAT} with the threshold at ~ 43 $^{\circ}$ C and a steep increase with further elevation of the temperature that was nearly completely blocked by the presence of Cu:Phe (Fig. 2B). There was always a substantial recovery ($77.8 \pm 6.6\%$; $n = 7$) after washing the cell for 1 min. four hundred micromolar *o*-phenanthroline alone did not have a significant effect on I_{HEAT} ($102.8 \pm 7.5\%$; $n = 5$), while CuSO₄ at a concentration of 100 μ M invariably increased I_{HEAT} by $44.6 \pm 12.0\%$ at 46 $^{\circ}$ C (Fig. 2C; $n = 8$).

3.2. Effects of Cu-o-phenanthroline on capsaicin-induced responses in wild type TRPV1

The responses to 1 μ M capsaicin at room temperature were also effectively blocked by Cu:Phe (100:400 μ M) (Fig. 3; $12.2 \pm 3.1\%$; $n = 13$) and this effect was reversible within 30 s ($67.4 \pm 6.0\%$; $n = 12$). The blocking effect of the capsaicin response by Cu:Phe was almost completely independent of temperature over the range 24–48 $^{\circ}$ C (Fig. 3A(b)). Unlike the heat evoked membrane currents, capsaicin responses were inhibited by *o*-phenanthroline itself (400 μ M) at a membrane potential of -70 mV (Fig. 3B). In contrast to the effects of Cu:Phe, the responses rapidly recovered from *o*-phenanthroline inhibition by increasing temperature, suggesting a relatively low-affinity for the uncomplexed form. Hundred micromolar CuSO₄ applied together with 1 μ M capsaicin did not exhibit significant effects on capsaicin-induced currents at steady state, only at higher concentrations, CuSO₄ potentiated capsaicin responses in a majority of HEK cells expressing TRPV1 ($167 \pm 53\%$ at 200 μ M; $n = 6$).

To determine whether the blocking action of Cu:Phe was voltage dependent, we used a voltage-ramp protocol consisting of a sustained period at -70 mV followed by a ramp to $+80$ mV and back to -70 mV applied at 0.19 mV/ms (Fig. 4A and B). Using this protocol, the effects of Cu:Phe 100:400 μ M on the current–voltage relationships of the capsaicin (1 μ M)-induced currents were determined and averaged (Fig. 4C). At this concentration of Cu:Phe, the capsaicin responses were completely inhibited over the whole voltage range. However, when lower concentration of Cu:Phe (10:40 μ M) was used, the Cu:Phe blocking effect on the capsaicin-induced currents was voltage dependent (Fig. 4D and E). In an attempt to distinguish between the effects of the complexed and

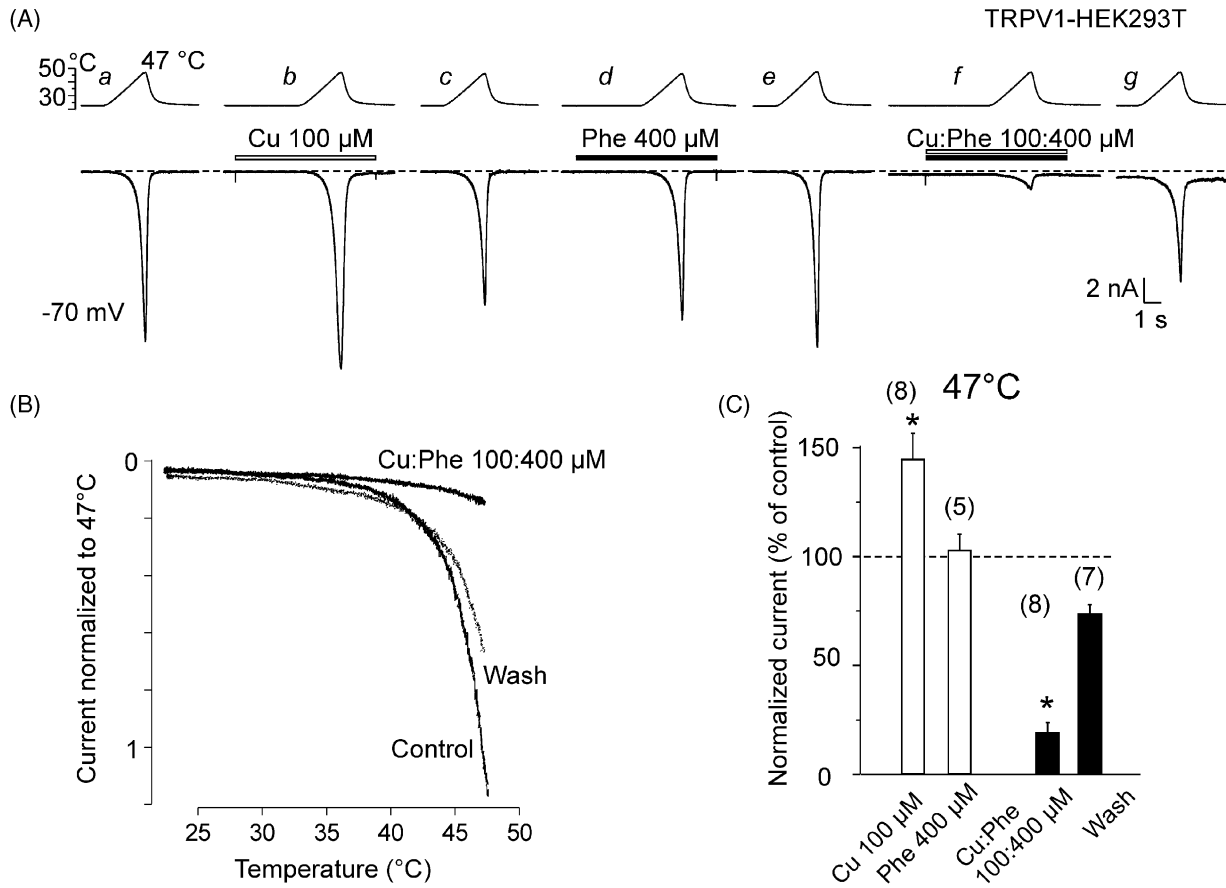


Fig. 2. Complex Cu-*o*-phenanthroline blocks membrane currents induced by noxious heat in TRPV1 transfected HEK 293T cells. (A) Whole cell membrane currents induced by 3 s ramps of heated solutions to 47 °C. (a) control, (b) in the presence of 100 μM CuSO₄, (c) wash, (d) in *o*-phenanthroline 400 μM, (e) wash, (f) in Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM, (g) wash. The upper row of the records shows the temperature of the superfusing solutions measured with a thermocouple inserted in the common outlet capillary of the drug application system. Dashed line represents zero current level. The bars above the records indicate the duration of the drug application. (B) Relationship of the membrane current and the temperature in control ECS and in the presence of Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM. (C) Normalized currents (% of the control response) measured at 47 °C in the presence of 100 μM Cu²⁺, *o*-phenanthroline 400 μM, Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM and wash. Numbers of cells examined are indicated above the columns.

the uncomplexed form, we used 400 μM *o*-phenanthroline with 1 μM capsaicin and the depolarizing voltage protocol as above. We found that *o*-phenanthroline caused partial inhibition of the inward currents evoked by capsaicin at negative potentials (by $48.4 \pm 12.9\%$ at -70 mV; $n = 7$), while this inhibition was completely removed at positive potentials (Fig. 4C).

The current–voltage relationship determined in the control solution preceding the application of capsaicin exhibited a pronounced outward rectification and this current was not blocked by Cu:Phe. This outward-rectifying current likely reflects a basal chemical or voltage-induced activity of TRPV1 channels overexpressed in HEK 293T cells (Ahern and Premkumar, 2002; Chuang et al., 2001; Vlachova et al., 2003). Since Cu:Phe fails to inhibit the same fraction of the channels that are activated at positive potentials in control conditions, the latter mechanism (i.e. intrinsic voltage sensitivity) seems to be more probable.

3.3. Blockade of currents activated by acidic pH by Cu:Phe

Acidic pH is a well-recognized agonist of the TRPV1 receptor (Jordt et al., 2000; Tominaga et al., 1998). In contrast to capsaicin, the responses induced by low pH have a fast onset and exhibit less desensitization upon repeated application. We found that prolonged pre-exposure (~30 s) to Cu:Phe 100:400 did not affect responses induced by pH (Fig. 5A); however, it produced a profound inhibition of the membrane currents during application of pH 5 solution (Fig. 5B). Upon rapid removal of Cu:Phe, the currents induced by low pH recovered monoexponentially. The time constant of the inhibition of the low pH-induced currents by Cu:Phe was substantially longer at the positive membrane potential +40 mV (Fig. 5C) ($\tau_{on} = 746 \pm 113$ ms) compared to that at -70 mV ($\tau_{on} = 146 \pm$

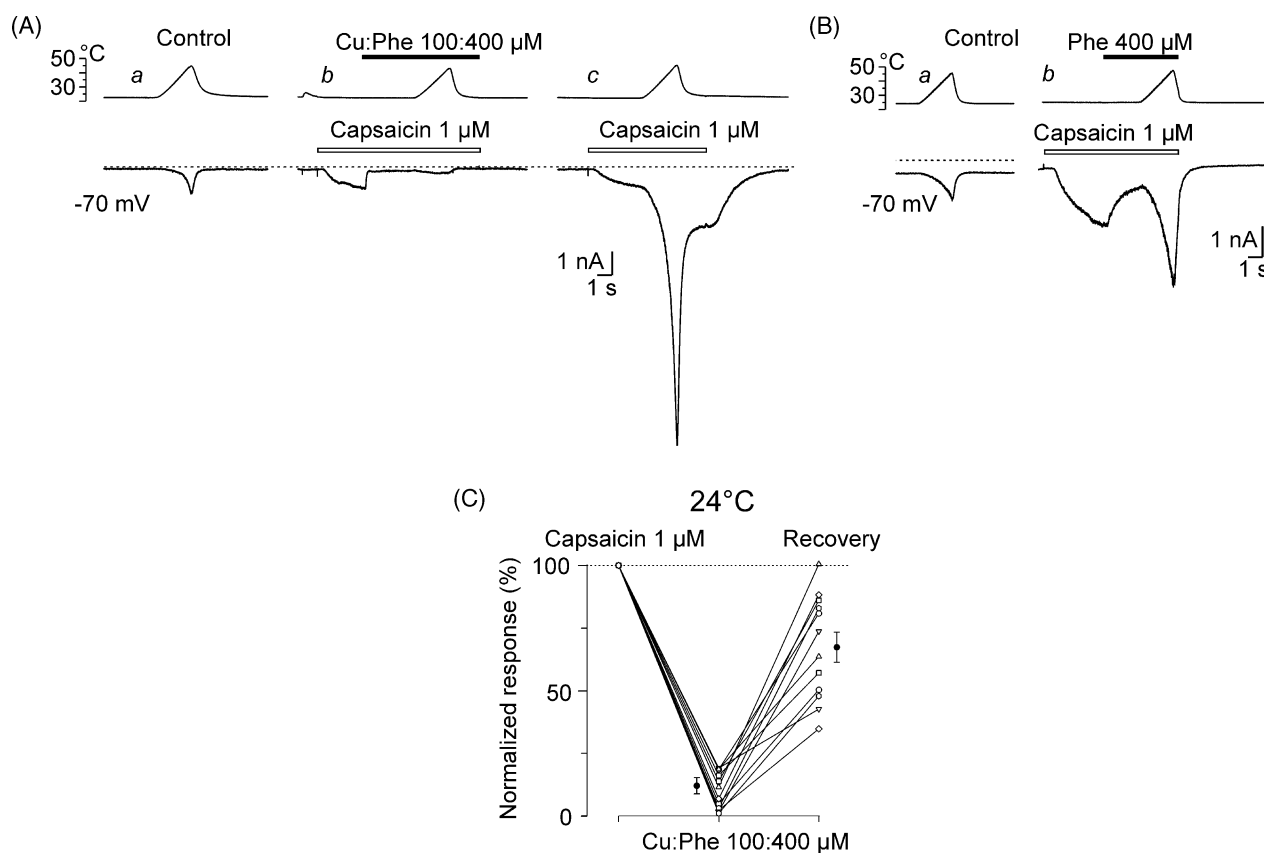


Fig. 3. The effects of Cu:Phe on capsaicin-induced responses in HEK 293T cells transfected with the wild type TRPV1. (A) (a) Whole cell membrane current induced by a 3 s ramp of heated solution to 47 °C. (b) The effects of Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM on the capsaicin-induced response at room temperature and during the 3 s ramp of elevated temperature to 47 °C. (c) Increase of the heat-induced membrane current in the presence of 1 μM capsaicin recorded 30 s later. The bars above the records show the duration of the drug application. The upper row of the records indicates the temperature of the superfusing solutions. (B) The effects of *o*-phenanthroline 400 μM on the capsaicin-induced response. Compare the effect of elevated temperature to the upper panel Ab and notice the fast recovery from inhibition. (C) Normalized steady-state responses induced by 1 μM capsaicin at room temperature in the absence and in the presence of Cu:Phe 100:400 μM ($n = 13$).

27 ms; $n = 3$; $p < 0.05$; Student's pair *t*-test) indicating a pronounced voltage dependence of the channel block.

In order to eliminate the possibility that the inhibition could be due to the effects of free copper (II) or the uncomplexed form of *o*-phenanthroline, control experiments were performed using acidic solution (pH 5) applied with CuSO₄ (100 μM) or *o*-phenanthroline (40 or 400 μM). At -70 mV, CuSO₄ alone had no significant effects on pH 5-induced responses ($99.7 \pm 3.0\%$; Student's paired *t*-test; $n = 13$). At a concentration of 400 μM, *o*-phenanthroline itself slightly inhibited responses elicited by pH 5 (by $36 \pm 11\%$ when measured after 10 s of pH 5 application together with 400 μM; $n = 6$); however, at -70 mV, this inhibition had an observed rate of 20.5 ± 12.2 and 13.6 ± 5.6 s for Phe 40 and 400 μM, respectively ($n = 6$), i.e. one order of magnitude slower than the onset rate derived for the complexed form (Fig. 5D). At +40 mV, the onset rate of inhibition was 28.9 ± 9.3 and 21.8 ± 8.2 s for 40 and 400 μM Phe, respectively ($n = 5$).

Both the onset and the offset of Cu:Phe-induced inhibition measured at -70 mV were concentration dependent (Fig. 6A and B). At a concentration of 10:40 μM, the estimated time constants were 2.2 ± 0.2 and 4.1 ± 0.5 s for the onset and offset ($n = 4$). The time constant of the inhibition decreased to 117 ± 22 ms and the time constant of unblocking increased to 10.0 ± 2.1 s at Cu:Phe 500:2000 μM ($n = 5$).

To assess the concentration dependence of the inhibition of the responses elicited by pH 5, we tested several concentrations of Cu:Phe at a constant molar ratio of 1:4 (CuSO₄:1,10-phenanthroline; 1:4, 10:40, 100:400 and 500:2000 μM). The current data were normalized to the currents evoked by pH 5 immediately before application of Cu:Phe. At concentrations of 100:400 and 500:2000 μM, the degree of inhibition was over 95%. A nonlinear least-squares fit of the Hill equation to the concentration-response data yielded an apparent IC₅₀ value of 5.2 μM (Cu : Phe = 5.2 : 20.8 μM) and a Hill coefficient 1.1 (Fig. 6C).

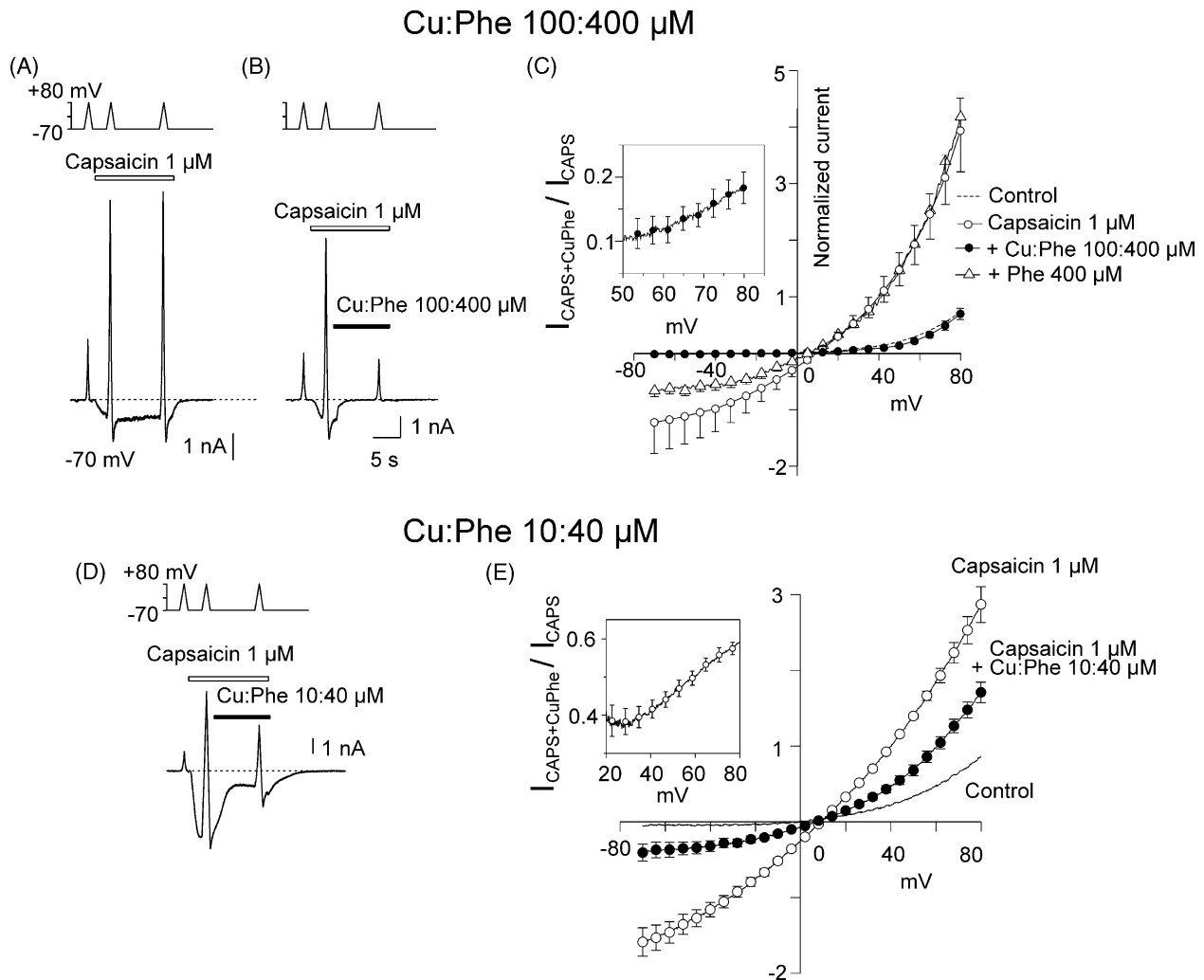


Fig. 4. Voltage dependence of capsaicin-induced responses to Cu:Phe block in HEK 293T cells transfected with wild type TRPV1. (A) Whole cell responses to 1 s voltage ramp from -70 to $+80$ mV (upper row) in the control extracellular solution (ECS) and in the presence of $1 \mu\text{M}$ capsaicin. (B) The voltage ramps were applied in the control ECS, in the presence of $1 \mu\text{M}$ capsaicin and in the presence of capsaicin together with Cu-*o*-phenanthroline $100:400 \mu\text{M}$. (C) I/V plot of the responses in the control (dashed line), in the presence of capsaicin (open circles), in the presence of capsaicin and Cu-*o*-phenanthroline $100:400 \mu\text{M}$ (filled circles) and in the presence of capsaicin with $400 \mu\text{M}$ *o*-phenanthroline (open triangles). The inset shows outward rectification of the ratio of the capsaicin-induced responses in the absence and in the presence of Cu:Phe ($n = 5$). Responses were normalized to current evoked by capsaicin at $+40$ mV. (D) Voltage ramps were applied in the control ECS, in the presence of $1 \mu\text{M}$ capsaicin and in the presence of capsaicin together with Cu-*o*-phenanthroline $10:40 \mu\text{M}$. (E) I/V plot of the responses in the control (solid line), in the presence of capsaicin (open circles) and in the presence of capsaicin with Cu-*o*-phenanthroline $10:40 \mu\text{M}$ (filled circles). The inset shows the fraction of unblocked capsaicin response as a function of the applied voltage ($n = 6$).

3.4. Cu-*o*-phenanthroline blocks the native capsaicin and heat-gated ion channels in DRG neurons

To assess whether the inhibitory effects of Cu:Phe on the recombinant TRPV1 homomers are similar to those on native channels, we tested the ability of Cu:Phe $100:400 \mu\text{M}$ to block the whole cell currents induced by noxious heat (49°C) and $1 \mu\text{M}$ capsaicin in cultured DRG neurons isolated from the rat (Fig. 7A and B). We found that Cu:Phe blocked the capsaicin- and heat-induced responses to a similar extent as in the TRPV1-293T cells. The current

amplitudes evoked by $1 \mu\text{M}$ capsaicin at 24°C were reduced to $14.3 \pm 4.9\%$ of the control ($n = 6$) and the heat-induced currents at 45°C were reduced to $21.2 \pm 5.1\%$ ($n = 8$). The blocking effects of Cu:Phe were nearly completely reversible upon washout ($74.6 \pm 10\%$ and $93.5 \pm 11.7\%$ of the control capsaicin and heat responses). Cu:Phe did not significantly affect the voltage-gated currents induced by 20 mV voltage steps from -80 to $+60$ mV in capsaicin-sensitive DRG neurons (Fig. 7C). These results indicate that the Cu:Phe complex blocks both the native and the recombinant TRPV1 receptor.

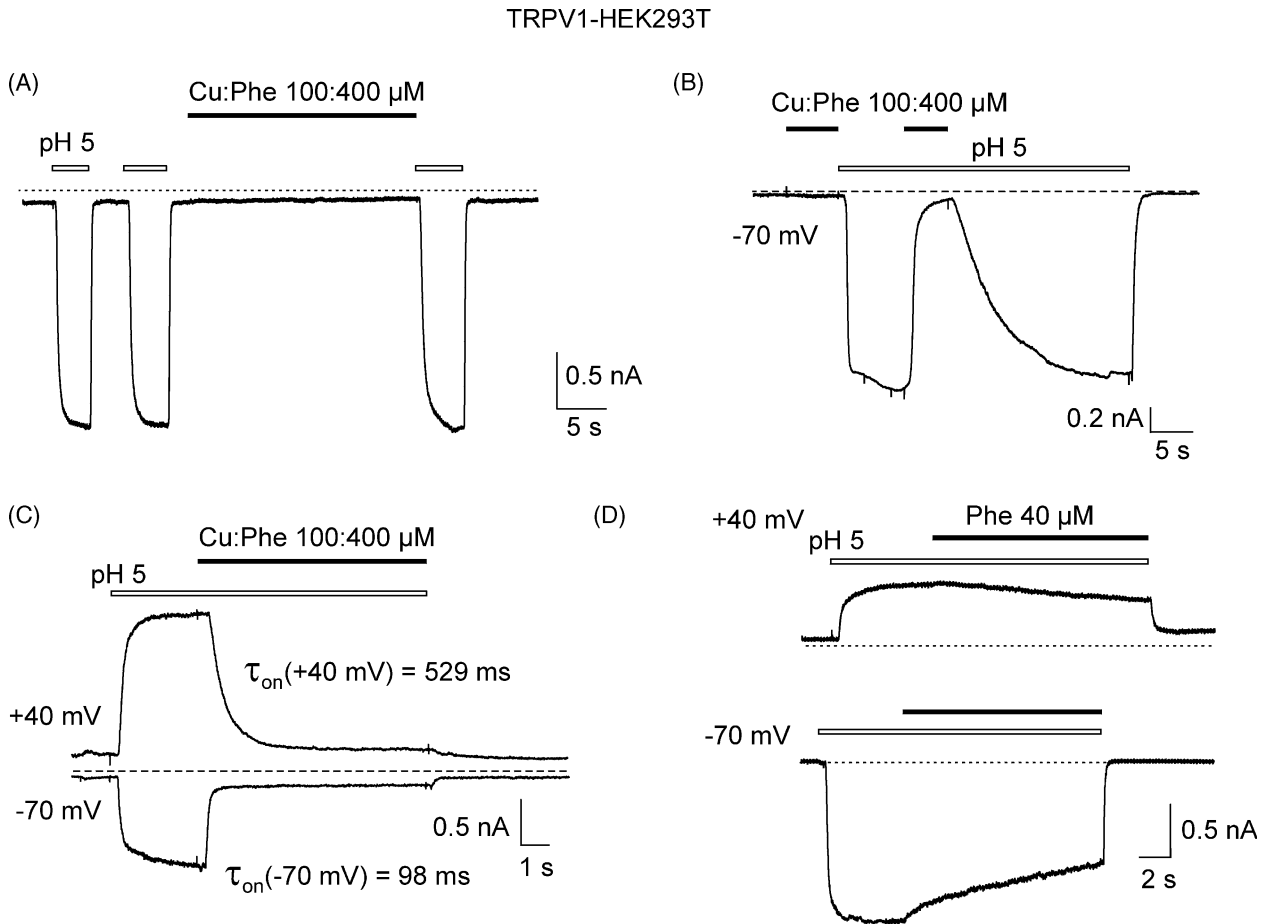


Fig. 5. The effects of Cu:Phe on the membrane currents induced by pH 5 in HEK 293T cells expressing wild type TRPV1. (A) Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM applied for a prolonged period (23 s) before pH 5 solution did not affect peak amplitude of the pH 5 response. (B) Responses to application of pH 5. Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM applied immediately before pH 5 solution did not affect the response; however, it inhibited the low pH-induced membrane current nearly completely. The cell was clamped at -70 mV. (C) The effects of Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM in another cell at -70 and +40 mV. Note the outward rectification of the membrane current induced by pH 5 and the longer time constant of the onset of the inhibition produced by Cu:Phe on the positive membrane potential. The bars above the records indicate the time of drug application. (D) Whole cell membrane currents induced by low pH were only slightly inhibited by 400 μM phenanthroline during the recording period of at least 10–15 s.

3.5. Inhibition of TRPV1 receptor by Cu-*o*-phenanthroline is not due to reaction with endogenous extracellularly located cysteines

Although the results clearly demonstrate that Cu:Phe blocks the TRPV1 channel in an open state, there are two possible blocking mechanisms that have to be considered. First, Cu:Phe as an oxidizing reagent could interact with the intramolecular or intermolecular sulfhydryl groups of the cysteine residues around the pore-forming loop. Second, Cu:Phe as a bulky, positive charged molecule, could block the channel by interacting with the negatively charged amino acids in the mouth of the channel. To decide between these two alternatives, we replaced all three putative extracellularly located cysteines (i.e. C616, C621 and C634) with glycine either individually or all together. The

mutants yielded functional channels with apparently normal gating behavior. The currents induced by capsaicin and heat were blocked by Cu:Phe (100:400 μM) similarly to wild type TRPV1. Representative responses of the TRPV1 mutant with all three cysteines replaced by glycine are shown in Fig. 8. The heat-induced membrane currents were inhibited by Cu:Phe 100:400 μM to $26.0 \pm 11.2\%$ of the control value at 47 °C ($n = 3$) (Fig. 8A and B), while Cu:Phe blocked the currents evoked by 1 μM capsaicin to $0.9 \pm 0.3\%$ ($n = 5$) at room temperature (Fig. 8D and E). Again, the blocking effects were reversible after return to control solution ($110.7 \pm 14.3\%$ and $90.6 \pm 23.5\%$ for heat and capsaicin). These findings, together with an almost complete reversibility of the Cu:Phe blocking effects, excluded the alternative that Cu:Phe inhibits the TRPV1 channel by modifying the SH groups of the

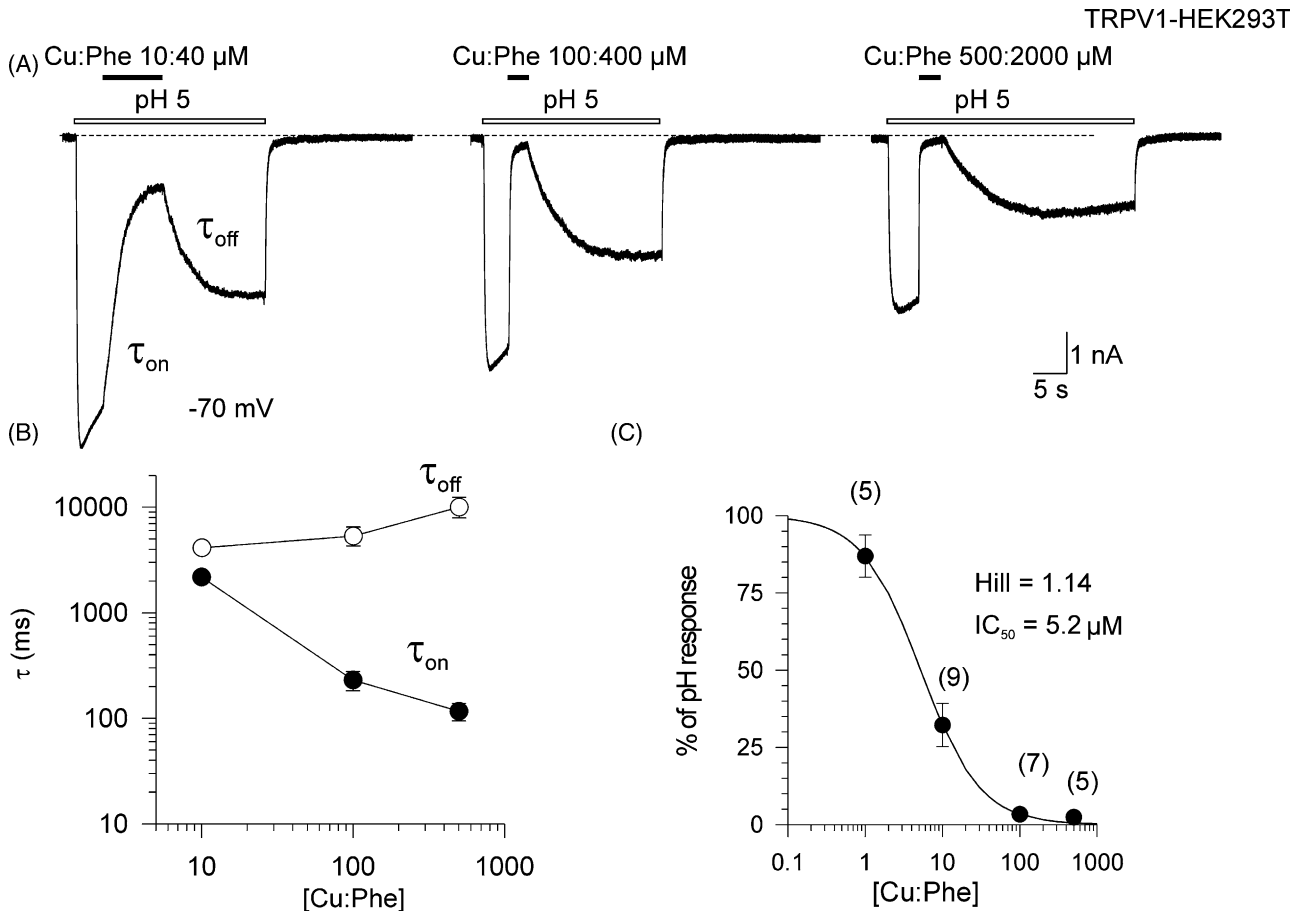


Fig. 6. The effects of Cu-*o*-phenanthroline are concentration dependent. (A) The effects of Cu:Phe at the concentrations 10:40, 100:400 and 500:2000 μM on the membrane currents induced by pH 5 recorded from one HEK 293T cell transfected with TRPV1. The bars above the records indicate the time of drug application. (B) Plots of the time constants of the onset (filled symbols) and the offset (open symbols) of the inhibition produced by Cu:Phe on the responses induced by pH 5. (C) Dose response curve of the inhibition of the membrane currents induced by pH 5 produced by Cu:Phe at -70 mV. The number of cells is indicated in brackets.

cysteine residues on the extracellular side of the TRPV1 receptor.

3.6. Cu-*o*-phenanthroline blocks menthol-induced responses in HEK 293T cells expressing wild type TRPM8

The voltage dependent blockade of TRPV1 by Cu-*o*-phenanthroline and a Hill coefficient of ~ 1 suggest that the complex binds close to the permeation pathway of the channel. Given the similarity of TRPV1 molecular architecture to other TRP family members, we tested whether TRPM8, a distant relative of vanilloid receptor family, can be blocked by Cu-*o*-phenanthroline. In heterologous expression systems, this channel has been shown to be activated by cool temperatures and menthol, a compound used for its cooling effects (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). We examined the effects of Cu:Phe on menthol-induced currents in HEK293T cells transfected with TRPM8. As illustrated in Fig. 9A,

100 μM (–)-menthol elicited rapidly activating membrane currents that were reversibly blocked by 100:400 μM Cu-*o*-phenanthroline. At -70 mV, Cu:Phe blocked the menthol activated inward currents by $86.4 \pm 0.2\%$ at room temperature (23°C) but had a smaller effect on outward currents at $+40$ mV ($41 \pm 8\%$; $n = 3$). The effects of Cu:Phe 100:400 μM on the menthol (100 μM) -induced currents were further analyzed by using the voltage-ramp protocol from -90 to $+80$ mV (Fig. 9B and C). Comparing the current–voltage relationship of the TRPM8 mediated currents with that induced by capsaicin in TRPV1-expressing HEK293T cells, a stronger voltage dependence of the Cu:Phe block is evident.

4. Discussion

Our results demonstrate that the complex Cu-*o*-phenanthroline blocks the TRPV1 channel in an open state

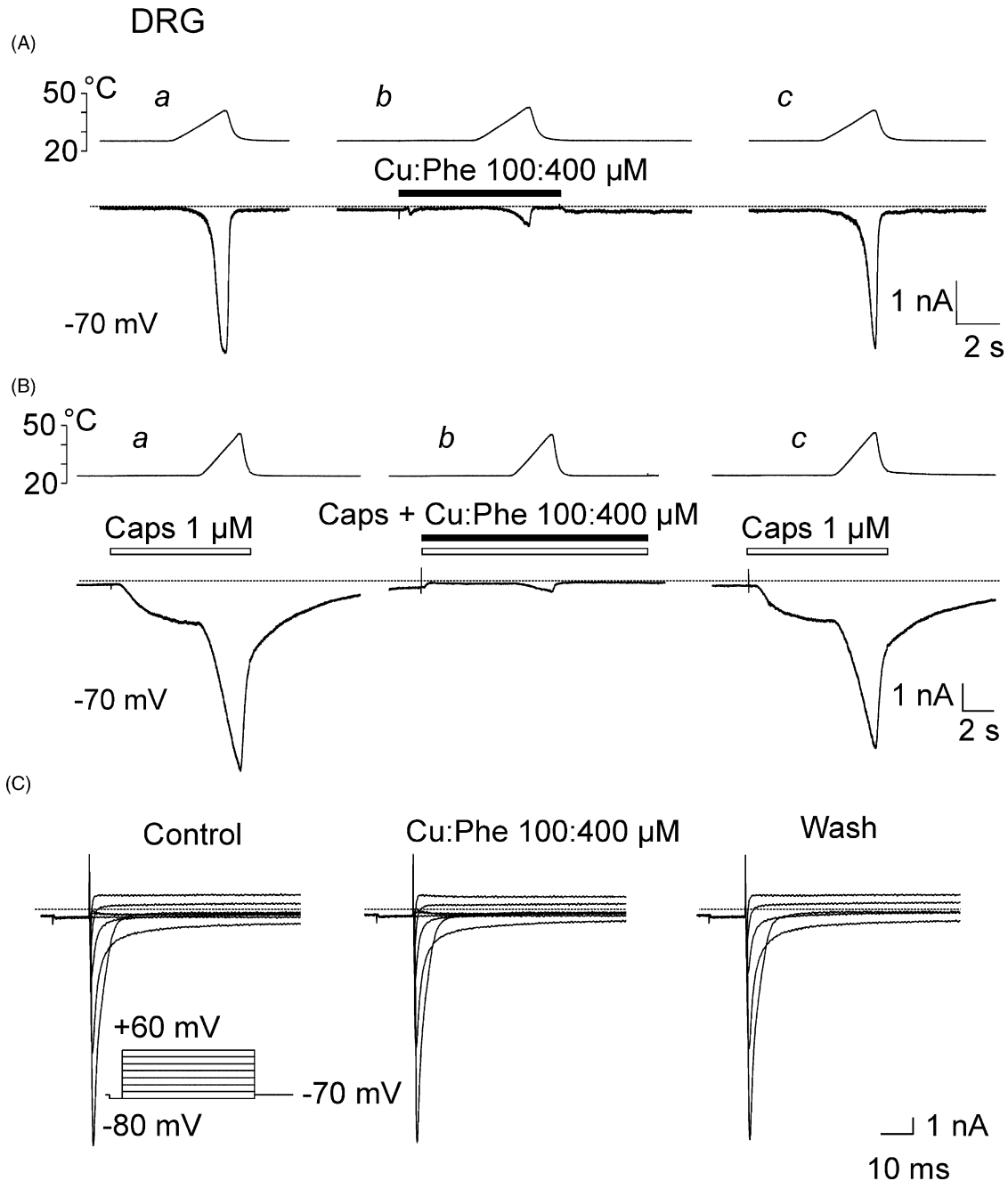


Fig. 7. The effects of Cu:Phe 100:400 μM on the heat and capsaicin-induced responses in rat DRG neurons and the lack of effects on voltage-induced currents. (A) Whole cell membrane currents induced by 3 s ramps of solutions heated to 47 °C. (a) control, (b) in the presence of Cu-phenanthroline 100:400 μM , (c) wash. (B) Whole cell membrane currents induced by 3 s ramps of heated solution in the presence of 1 μM capsaicin (a), in the presence of 1 μM capsaicin together with Cu-phenanthroline 100:400 μM (b) and in the presence of 1 μM capsaicin (c). The bars above the records show the time of the drug application. (C) Membrane currents induced by 20 mV voltage steps from -80 to +60 mV (shown in the inset). The left-hand and the right-hand records are controls and in the middle Cu-phenanthroline 100:400 μM was applied.

in a concentration dependent manner. The blocking effect of Cu:Phe is reversible and does not involve extracellularly located cysteines. Similar blocking effects were observed in small DRG neurons activated by capsaicin or noxious heat.

Cu-phenanthroline complex, besides the specific sulfhydryl reagents MTSEA (2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide) and MTSET (2-(trimethylammonium)ethyl methanethiosulfonate bromide), has been widely used to investigate the structure

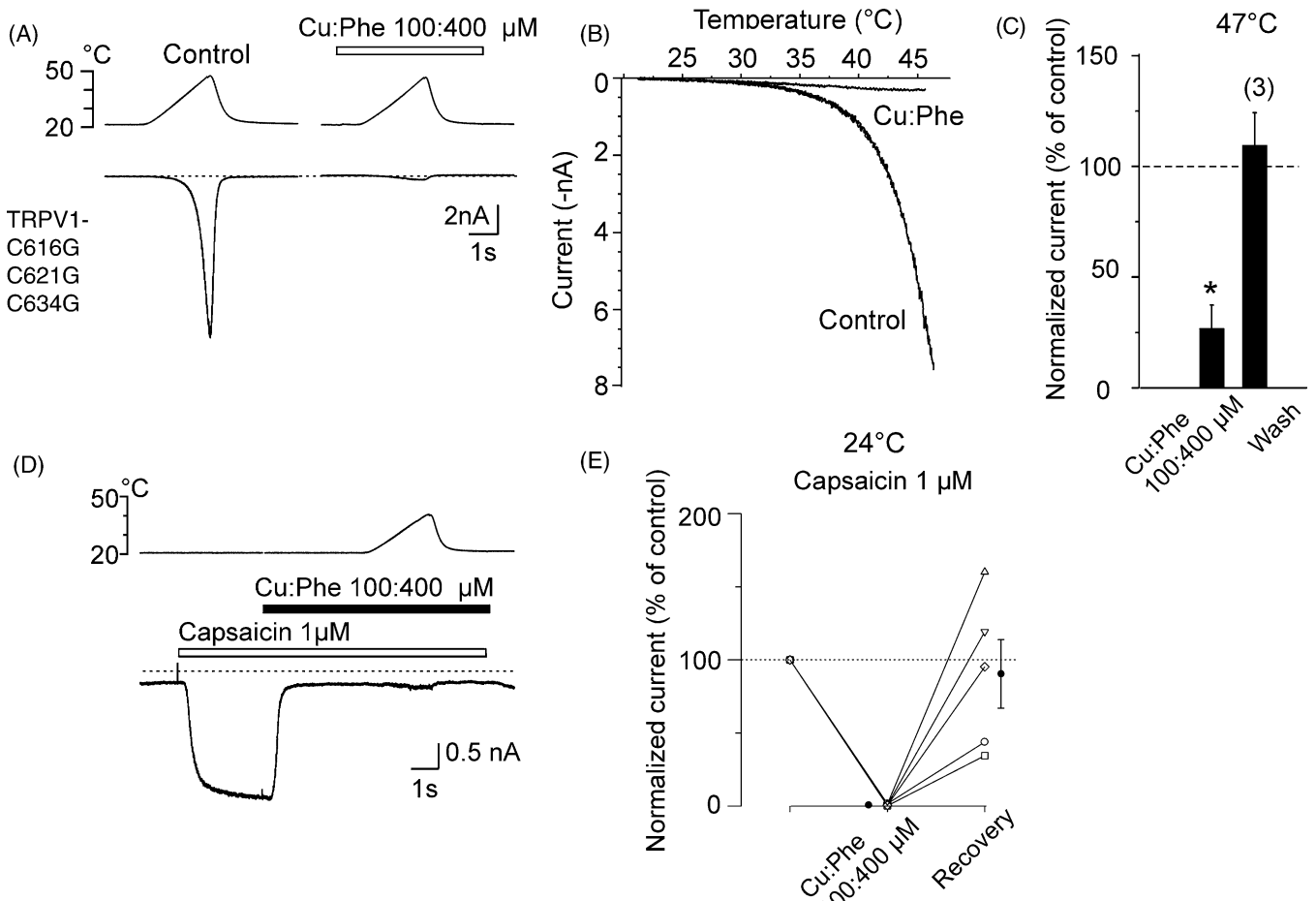


Fig. 8. The effects of Cu:Phe 100:400 μM on heat and capsaicin-induced responses in HEK 293T cells transfected with triple-mutant of TRPV1: C616G/C621G/C634G. (A) Whole cell membrane currents induced by a 3 s ramp of heated solution to 47 °C in the control and in the presence of Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM . (B) Plot of the current-temperature relationship in the control and in the presence of Cu:Phe. (C) Normalized responses to heat in the presence of Cu:Phe and after wash ($n = 3$). (D) The effects of Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM on the response induced by 1 μM capsaicin at the room temperature and during a ramp of increasing temperature to 47 °C (shown above the record). (E) The effects of Cu:Phe on the membrane currents induced by 1 μM capsaicin at room temperature and the recovery in five cells. Currents were normalized to the currents evoked by 1 μM capsaicin before application of Cu:Phe.

of channels in various functional states (Holmgren et al., 1996; Karlin and Akabas, 1998). For example, at low micromolar concentrations, Cu:Phe has been shown to cause the opening of the cyclosporin A-sensitive channel in the inner mitochondrial membrane (Costantini et al., 1996). By employing the substituted cysteine accessibility method and Cu:Phe as an oxidizing agent, evidence was provided that cysteine introduced at the extracellular end of S4 of the Shaker K⁺ channel (L361C) forms an intersubunit disulfide bridge with its counterpart in the neighboring subunit (Aziz et al., 2002). In the voltage-activated K⁺ channel, Cu:Phe at low concentration (2:100 μM) was used to probe the state-dependent accessibility of cysteines introduced in the outer mouth of the channel (Liu et al., 1996). In another type of potassium channel, K_{ir1.1} that underlies K⁺ secretion in kidney, Cu:Phe has been utilized to

study the pH-dependent gating mechanisms (Schulte et al., 1998). Cu:Phe was also used to examine conformational changes in GABA_A receptors (Horenstein et al., 2001; Shan et al., 2002) and to analyze intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels (Rosenbaum and Gordon, 2002).

The evidence that the reducing agent dithiothreitol (DTT) markedly increases the responses to noxious heat and capsaicin in rat DRG neurons and in TRPV1 transfected HEK 293 cells (Vyklícky et al., 2002) led us to the idea that Cu:Phe might modify the redox state of the cysteine residues located in and around the pore-forming loop of the TRPV1 channel. Indeed, our results demonstrating that Cu:Phe strongly blocks the opened TRPV1 channels expressed in transfected HEK 293T cells and in cultured DRG neurons seemed to be compatible with this idea. However, our experiments in

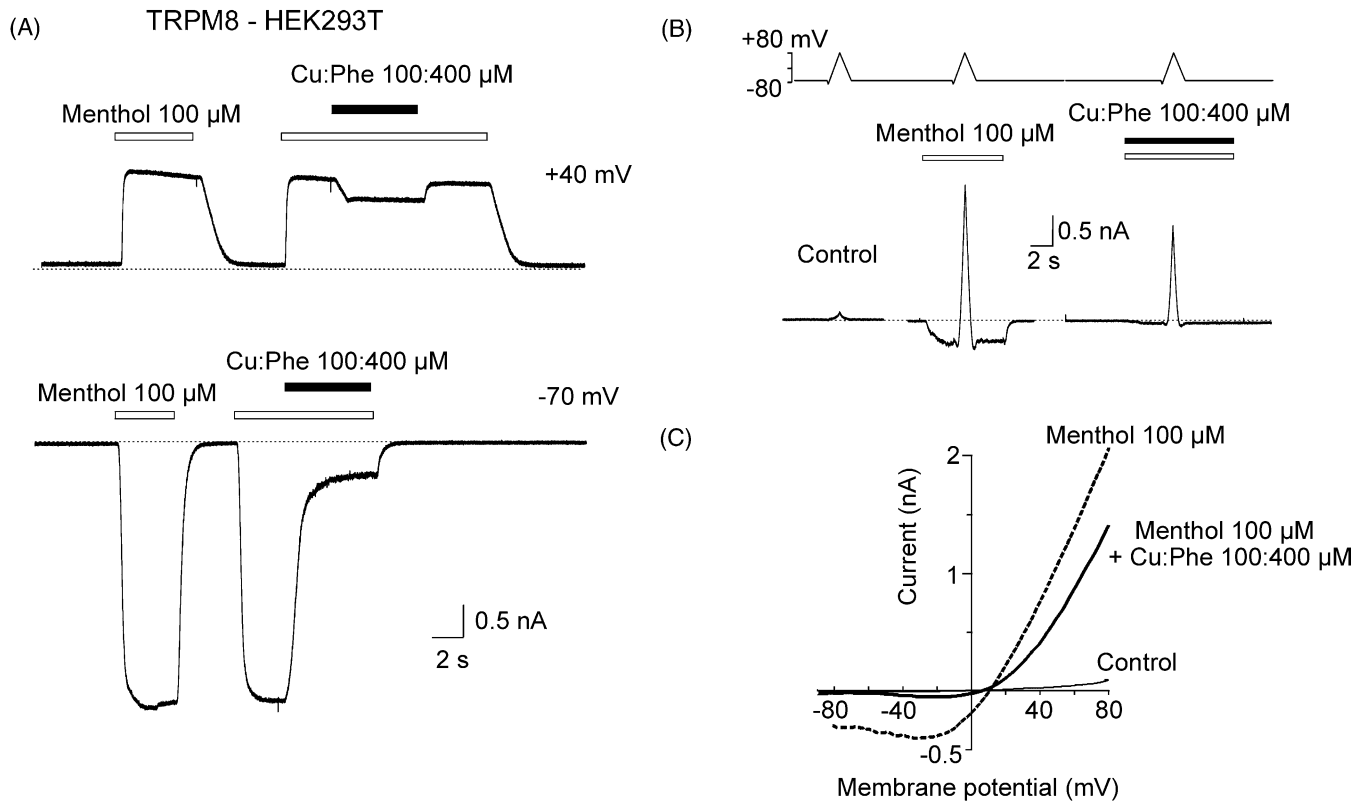


Fig. 9. The effects of Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM on menthol-induced currents in HEK 293T cells expressing wild type TRPM8. (A) Whole cell membrane currents induced by 100 μM (-)-menthol were blocked by Cu:Phe 100:400 μM at room temperature (23 $^{\circ}\text{C}$). (B) Voltage ramps were applied in the control ECS, in the presence of 100 μM (-)-menthol and in the presence of menthol together with Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM . (C) I/V plot of the responses in the control (thin solid line), in the presence of menthol (dashed line) and in the presence of menthol and Cu-*o*-phenanthroline 100:400 μM (thick solid line).

which we substituted glycine for any of the cysteines C616, C621 and C634 individually or for all of them together excluded this possibility because no obvious changes in the sensitivity to capsaicin, low pH or noxious heat were observed in these mutated TRPV1 channels, nevertheless Cu:Phe retained its effectiveness in blocking the channels in open state. The effects of Cu:Phe were not dependent on the mode of receptor activation, i.e. whether the channels were activated by capsaicin, low pH or noxious heat, indicating that Cu:Phe does not interfere with binding of the agonist to the receptor recognition sites or with the domain responsible for the conformation changes leading to I_{HEAT} .

Although the concentration dependence of the effects of Cu:Phe on TRPV1 channels is evident from our results, the dose response curve in Fig. 6C has to be interpreted cautiously because Cu^{2+} alone (as CuSO_4) at 100 μM significantly increased responses induced by noxious heat (Fig. 2A(b) and C). At high concentrations (400 μM), *o*-phenanthroline alone inhibited responses induced by capsaicin or low pH in some experiments. These effects cannot be explained by che-

lation of trace amounts of Cu^{2+} by *o*-phenanthroline in the control ECS (see Kobashi, 1968) as *o*-phenanthroline alone did not inhibit responses induced by noxious heat at all. The underlying mechanism for such effect has to be further explored, however, $\text{p}K_a$ 5 of Cu:Phe excludes the possibility that free Cu^{2+} could be present in a concentration sufficient to influence these effects significantly. On the other hand, it is not completely excluded that complexation of *o*-phenanthroline with trace amounts of Cu^{2+} can contribute to the inhibitory effects of *o*-phenanthroline alone on responses to capsaicin and low pH.

The apparent affinity of TRPV1 for Cu:Phe was examined on channels opened by low pH because the responses are fast and exhibit only a modest desensitization upon repeated application (Fig. 6). Our results indicate that the process of blocking is fast and concentration dependent, while the process of unblocking is slow and less dependent on Cu:Phe concentration. The pronounced difference between the fast kinetics of the blocking and the slow kinetics of unblocking can be well understood because the large positively charged molecule of Cu:Phe can be expected to enter the chan-

nel more easily in the open state than to leave it when the channel is closed. The speed of the blocking effects of Cu:Phe on TRPV1 channels opened by capsaicin was similar to that induced by low pH, however, the evaluation of the process of unblocking was complicated by desensitization of the receptor and by prolonged binding of capsaicin to the receptor.

Cu:Phe at a concentration of 100:400 μM strongly inhibits the responses induced by ramps of increasing temperature from 24 to 48 °C. We frequently found it difficult to decide whether the remaining currents observed in the presence of Cu:Phe could be attributed to the activity of TRPV1 channels or whether it represented a leak current due to unspecific effects of increased temperature on other channels present in the plasma membrane of the cells. Nevertheless, the effects of Cu:Phe were quickly reversible suggesting that the increased temperature that opens the channel contributes to the speed of unblocking.

Therefore, these findings and the fast kinetics of the blocking effects on TRPV1 channel in an open state makes it likely that the bulky, highly positively charged complex of copper-*o*-phenanthroline enters the extracellular mouth of the channel and blocks it at the location where several negatively charged amino acid residues control ion permeability of the channel and exert energy to stick large positively charged molecules that cannot pass through the channel. Our finding that membrane currents induced by menthol in the cold sensitive receptor TRPM8 that is only distantly related to TRPV1 makes it likely that similar blocking effects of Cu:Phe can be expected to occur in other TRP channels.

In conclusion, our results demonstrate that copper-*o*-phenanthroline, in addition to its well known effects as an oxidizing reagent, acts as an open channel blocker of the TRPV1 channels expressed in HEK 293T cells and of the native capsaicin receptors expressed in rat DRG neurons. This suggests that besides ruthenium red (Dray et al., 1990), arginine-rich peptides (Planells-Cases et al., 2000) and trialkylglycines DD161515 and DD191515 (Garcia-Martinez et al., 2002) that act on capsaicin receptor as noncompetitive antagonists, Cu:Phe can be considered as an additional effective and reversible open channel blocker potentially useful in further investigation of structure–function relationship of the TRPV and possibly other TRP channels.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant Agency of the Czech Republic, 305/03/0802 and 309/02/1479, Research Project of the AS CR, AVOZ 5011922 and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the

Czech Republic, LN00B122. We thank Charles Edwards for a critical reading of the manuscript.

References

- Ahern, G.P., Premkumar, L.S., 2002. Voltage-dependent priming of rat vanilloid receptor: effects of agonist and protein kinase C activation. *Journal of Physiology* 545, 441–451.
- Aziz, Q.H., Partridge, C.J., Munsey, T.S., Sivaprasadarao, A., 2002. Depolarization induces intersubunit cross-linking in a S4 cysteine mutant of the Shaker potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42719–42725.
- Bevan, S., Docherty, R.J., 1993. Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In: Wood, J.N. (Ed.), *Capsaicin in the Study of Pain*. Academic Press, London, pp. 27–44.
- Bevan, S., Yeats, J., 1991. Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *Journal of Physiology* 433, 145–161.
- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W.t., 2002. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35, 721–731.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.
- Cesare, P., McNaughton, P., 1996. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93, 15435–15439.
- Cesare, P., Dekker, L.V., Sardini, A., Parker, P.J., McNaughton, P.A., 1999. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23, 617–624.
- Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D., 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411, 957–962.
- Costantini, P., Chernyak, B.V., Petronilli, V., Bernardi, P., 1996. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *Journal of Biological Chemistry* 271, 6746–6751.
- Dittert, I., Vlachova, V., Knotková, H., Vitásková, Z., Vyklícky, L., Kress, M., Reeh, P.W., 1998. A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *Journal of Neuroscience Methods* 82, 195–201.
- Dray, A., Forbes, C.A., Burgess, G.M., 1990. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neuroscience Letters* 110, 52–59.
- Garcia-Martinez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De La Pena, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Perez-Paya, E., Belmonte, C., Messguier, A., Ferrer-Montiel, A., 2002. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 2374–2379.
- Gordon, S.E., Varnum, M.D., Zagotta, W.N., 1997. Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 19, 431–441.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723.
- Holmgren, M., Liu, Y., Xu, Y., Yellen, G., 1996. On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacology* 35, 797–804.

- Horenstein, J., Wagner, D.A., Czajkowski, C., Akabas, M.H., 2001. Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABA(A) receptor pore-lining M2 segment. *Nature Neuroscience* 4, 477–485.
- Jahnel, R., Dreger, M., Gillen, C., Bender, O., Kurreck, J., Hucho, F., 2001. Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *European Journal of Biochemistry* 268, 5489–5496.
- Jordt, S.E., Tominaga, M., Julius, D., 2000. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 8134–8139.
- Karlin, A., Akabas, M.H., 1998. Substituted-cysteine accessibility method. *Methods in Enzymology* 293, 123–145.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J., Blumberg, P.M., 2001. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry* 276, 28613–28619.
- Kobashi, K., 1968. Catalytic oxidation of sulfhydryl groups by o-phenanthroline copper complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 158, 239–245.
- Kuzhikandathil, E.V., Wang, H., Szabo, T., Morozova, N., Blumberg, P.M., Oxford, G.S., 2001. Functional analysis of capsaicin receptor (vanilloid receptor subtype 1) multimerization and agonist responsiveness using a dominant negative mutation. *Journal of Neuroscience* 21, 8697–8706.
- Liu, Y., Jurman, M.E., Yellen, G., 1996. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* 16, 859–867.
- McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., Julius, D., 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M., 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C epsilon and identification of two target serine residues. *Journal of Biological Chemistry* 277, 13375–13378.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705–715.
- Planells-Cases, R., Aracil, A., Merino, J.M., Gallar, J., Perez-Paya, E., Belmonte, C., Gonzalez-Ros, J.M., Ferrer-Montiel, A.V., 2000. Arginine-rich peptides are blockers of VR-1 channels with analgesic activity. *FEBS Letters* 481, 131–136.
- Rathee, P.K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G.K., Wang, S.Y., Nau, C., Kress, M., 2002. PKA/AKAP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *Journal of Neuroscience* 22, 4740–4745.
- Rosenbaum, T., Gordon, S.E., 2002. Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron* 33, 703–713.
- Schulte, U., Hahn, H., Wiesinger, H., Ruppersberg, J.P., Fakler, B., 1998. pH-dependent gating of ROMK (Kir1.1) channels involves conformational changes in both N and C termini. *Journal of Biological Chemistry* 273, 34575–34579.
- Shan, Q., Haddrill, J.L., Lynch, J.W., 2002. Comparative surface accessibility of a pore-lining threonine residue (T6') in the glycine and GABA(A) receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44845–44853.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531–543.
- Vlachova, V., Teisinger, J., Susankova, K., Lyfenko, A., Ettrich, R., Vyklicky, L., 2003. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *Journal of Neuroscience* 23, 1340–1350.
- Vyklicky, L., Vlachova, V., Vitaskova, Z., Dittert, I., Kabat, M., Orkand, R.K., 1999. Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *Journal of Physiology* 517, 181–192.
- Vyklicky, L., Lyfenko, A., Susankova, K., Teisinger, J., Vlachova, V., 2002. Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience* 111, 435–441.
- Wood, J.N., Docherty, R., 1997. Chemical activators of sensory neurons. *Annual Review of Physiology* 59, 457–482.

5.3 Modulace TRPV1 receptoru gadoliniem

Trojmocný kationt gadolinium (Gd^{3+}) patřící mezi lanthanidy působí jednak jako blokátor mechanosenzitivních kanálů, jednak jako blokátor různých typů napěťově aktivovaných selektivních (vápníkových, draslíkových, sodíkových) i neselektivních kationtových kanálů. Blokuji účinek gadolinia na kationtové kanály je často zprostředkovan přímou interakcí s negativně nabitými aminokyselinami (glutamátem nebo aspartátem) v póru kanálu, protože jeho iontový poloměr je téměř stejný jako u jednomocného sodíku nebo dvojmocného vápníku, které jsou hlavními nosiči nábojů. V případě mechanosenzitivních iontových kanálů se uvažuje také o jiném mechanismu inhibice lanthanidy: vysoce afinitní kationt Gd^{3+} vytváří elektrostatické účinky na okolní lipidové dvojvrstvě a nepřímo tak mění mechanickou citlivost iontových kanálů. Stlačení lipidů vyvolané gadoliniem může působit laterálním tlakem na proteiny a tak usnadňovat nebo vyvolávat konformační změny membránových domén, jež vedou k uzavření iontového kanálu. Mechanosenzitivními iontovými kanály, které jsou blokovány lanthanidy, jsou např. TRPA1 a TRPV4 patřící spolu s TRPV1 do skupiny TRP kationtových kanálů. Na základě strukturální podobnosti a příbuznosti těchto kanálů jsme v naší studii chtěli objasnit, zda by také vaniloidní receptor TRPV1 mohl být citlivý na změny tlaku okolní membrány způsobené přítomností gadolinia.

Při studiu mechanismů modulace TRPV1 gadoliniem jsme se zabývali zodpovězením následujících otázek:

- Jaké účinky bude mít gadolinium na TRPV1 za různých experimentálních podmínek a mohou být účinky kladně nabitého gadolinia zprostředkovány negativně nabitými glutamáty E600 a E648?
- Dá se říci, že gadolinium působí podobným mechanismem jako protony?
- Lze účinky gadolinia zobecnit pro iontové kanály celé TRPV skupiny nebo jsou úzce specifické pouze pro TRPV1 receptor?
- Jak se podílí na účincích gadolinia jeho atomová hmotnost a budou podobně působit i jiné kationy?

Zjistili jsme, že gadolinium při pokojové teplotě a klidovém membránovém potenciálu aktivuje TRPV1 receptor koncentračně závislým způsobem. Pro charakterizaci tohoto účinku jsme porovnávali membránové proudy vyvolané gadoliniem s proudy vyvolanými nízkým pH (pH 5). Poloviční maximální aktivace proudů (EC_{50}) bylo na negativním membránovém potenciálu -70 mV dosaženo při koncentraci $260 \mu\text{M}$, zatímco na pozitivním membránovém potenciálu $+40$ mV byla poloviční maximální účinná koncentrace nižší ($72 \mu\text{M}$). I když je TRPV1 receptor aktivován gadoliniem koncentračně závislým způsobem, zaznamenali jsme, že odpovědi byly při vyšších koncentracích ($> 300 \mu\text{M}$) blokovány a tato blokáda byla na negativních membránových potenciálech vyšší. Ověřovali jsme hypotézu, zda mechanismus, kterým gadolinium působí na TRPV1 kanál, může být podobný mechanismu otevírání tohoto kanálu prostřednictvím protonů. Vzhledem ke zřejmým podobnostem v aktivační kinetice TRPV1 receptoru působením gadolinia a protonů, jsme porovnávali účinek gadolinia na membránové proudy vyvolané rychlou změnou teploty extracelulárního roztoku z 25°C na 46°C . Při pokojové teplotě $100 \mu\text{M}$ gadolinium aktivovalo membránový proud o velikosti 1.7 nA, při nižších teplotách ($< 35^\circ\text{C}$) se proud lineárně zvětšoval se vzrůstající teplotou, avšak při vyšších teplotách ($\geq 35^\circ\text{C}$) již docházelo k rovnováze mezi aktivací a blokádou kanálu a k převážením blokujícího účinku nad aktivačním. Při aplikaci 1 mM gadolinia výrazně převažoval blokující účinek, který byl jen částečně vratný, a blokáda přetrvávala i po delším promytí buňky kontrolním roztokem. Abychom mohli určit, do jaké míry jsou tyto účinky gadolinia závislé na přítomnosti extracelulárního vápníku, aplikovali jsme 1 mM gadolinium v extracelulárním roztoku, jenž neobsahoval vápenaté ionty. Teplem vyvolané proudy byly i za těchto podmínek gadoliniem prakticky blokovány, což dokazuje, že působení gadolinia není závislé na vápníku.

K tomu, abychom podrobněji prozkoumali místa aktivace a mechanismus, jakým gadolinium aktivuje nebo moduluje TRPV1 kanál, měřili jsme amplitudy membránových proudů vyvolaných zvyšováním koncentrace gadolinia v extracelulárním roztoku o pH 6. Maximální hodnoty těchto proudů byly normalizovány vzhledem k amplitudám proudů vyvolaných $100 \mu\text{M}$ gadoliniem v roztoku o pH 7.3 na téže buňce. Vzhledem k průvodní blokádě při vyšších koncentracích nebylo možné získat přesnější odhad EC_{50} a Hillova koeficientu pro

Gd³⁺, avšak z výsledků bylo patrné, že vlivem sníženého pH došlo ke zvýšení afinity TRPV1 receptoru ke gadoliniumu.

Na základě těchto výsledků jsme proto ověřovali hypotézu, že se gadolinium, kromě schopnosti aktivovat kanál, může také podílet na senzitivaci kanálu podobným mechanismem jako protony a interagovat s negativně nabitými aminokyselinovými zbytky (glutamáty E600 a E648) v póru TRPV1 kanálu, o kterých je známo, že jsou klíčové pro aktivaci a senzitivaci tohoto kanálu protony (Jordt et al., 2000). Zjistili jsme, že 100 μM gadolinium senzitivuje membránové proudy vyvolané kapsaicinem, přičemž toto zvýšení bylo vyšší, než součet amplitud proudů vyvolaných kapsaicinem a gadoliniumem, které byly snímány po minutovém promytí. Gadolinium v koncentraci 1 mM tyto proudy již silně inhibovalo. Z těchto pokusů bylo zřejmé, že gadolinium působí jednak jako přímý aktivátor, ale také jako blokátor i účinný modulátor TRPV1 kanálu.

Abychom dále ověřili naši hypotézu o působení gadolinia, studovali jsme jeho vliv na dvou mutantech TRPV1 receptoru, u kterých byly bodovou mutací zaměněny glutamátové zbytky v pozicích 600 a 648 (E600 a E648) za neutrální aminokyselinu alanin (E600A a E648A) (Jordt et al., 2000). Buňky transfekované konstruktem E600A byly celkově méně citlivé a méně stabilní během měření, což naznačovalo potencionálně škodlivý vliv mutace na životaschopnost buněk. Oba mutanty vykazovaly odlišnou citlivost na protony (pH 5): u mutantu E648A byly významně sníženy odpovědi aktivované pH 5, kdežto u mutantu E600A téměř vymizely. V porovnání s kontrolním wild typem (WT) měly také značně snížené membránové odpovědi vyvolané 1 μM kapsaicinem i bolestivým teplem (> 43 °C). Při testování úlohy glutamátů E600 a E648 v aktivaci či modulaci TRPV1 kanálu zprostředkované gadoliniumem byly pozorovány významné funkční rozdíly mezi WT a mutanty. U mutantu E600A byla snížena amplituda proudů vyvolaných kapsaicinem v přítomnosti 100 μM gadolinia na 53 %. Gadolinium se neuplatnilo jako aktivátor mutantu E600A a v koncentracích 30 μM a 100 μM pouze blokovalo odpovědi vyvolané teplem. Naproti tomu mutace na pozici 648 odstranila schopnost gadolinia senzitivovat proudy vyvolané kapsaicinem, ale tento mutant si zachoval citlivost ke gadoliniumu. U tohoto mutantu E648A blokovalo gadolinium v koncentraci 1 mM membránové proudy vyvolané kapsaicinem i bolestivým teplem. Tyto výsledky dokládaly, že se oba glutamátové zbytky přímo účastní regulace citlivosti TRPV1 kanálu vůči gadoliniumu: E600 je kritický

pro aktivaci i modulaci TRPV1 kanálu gadoliniem, kdežto E648 reguluje gadoliniem zprostředkovanou potenciaci proudů vyvolaných kapsaicinem. Mutant E648A je méně citlivý ke gadolinu.

Zajímalo nás, do jaké míry mohou být účinky gadolinia podmíněny jeho velkou atomovou hmotností (167.25), a proto jsme testovali účinek hliníku, jenž je rovněž trivalentním kationtem, ale má daleko nižší atomovou hmotnost (26.98) než gadolinium a nepatří mezi lanthanidy. Zjistili jsme, že na rozdíl od gadolinia nevyvolávala aplikace hliníku (30 μM a 100 μM) žádné membránové proudy a nebyl prokázán aktivační ani senzitivizační účinek. Hliník blokoval TRPV1 receptor již v koncentracích 100 μM .

Položili jsme si také otázku, zda jsou naše výsledky o působení gadolinia specifické pouze pro TRPV1 receptor, nebo zda je lze očekávat i u dalších TRPV receptorů z velké skupiny TRP kanálů. Účinek gadolinia jsme proto testovali na teplotně citlivém TRPV3 receptoru, jenž je strukturálně příbuzný TRPV1. Porovnáním sekvencí určitých oblastí póru potkaního TRPV1 a lidského TRPV3 bylo odhaleno, že konzervované glutamátové zbytky na pozicích 610 a aspartátové na pozicích 643 u TRPV3 odpovídají glutamátovým zbytkům 600 a 648 u TRPV1. Na rozdíl od účinků gadolinia na TRPV1 receptor blokovalo gadolinium již ve velmi malých koncentracích ($\leq 10 \mu\text{M}$) u TRPV3 receptoru membránové proudy vyvolané jeho agonistou, 2-APB. Shodně s TRPV1 receptorem gadolinium v koncentraci 1 mM výrazně blokovalo membránové proudy vyvolané teplem. Tyto výsledky ukázaly, že gadolinium neaktivuje ani nesenzitivizuje TRPV3 receptor, ale oba typy aktivace (chemickou i tepelnou) blokuje.

V souhrnu lze říci, že gadolinium působí na TRPV1 receptor třemi různými účinky: aktivačním, senzitivizačním a inhibičním. Aktivační účinek gadolinia na TRPV1 receptor při pokojové teplotě lze jen obtížně farmakologicky charakterizovat na základě koncentrační závislosti, především z důvodů jeho blokujícího účinku při vyšších koncentracích. Hodnota poloviční maximální účinné koncentrace protonů pro vyvolání membránových proudů (pH_{50}) na TRPV1 kanálu exprimovaném na HEK buňkách byla odhadnuta 5.4 při 22 °C (Tominaga et al., 1998). Zjistili jsme, že minimální koncentrace gadolinia pro aktivaci TRPV1 kanálu je při pokojové teplotě v rozsahu mezi 10 a 30 μM . Tato koncentrace je více než o řád vyšší než je nezbytné pro vytvoření podobného účinku protony. Z těchto faktů vyplývá, že buď má receptor nižší afinitu ke gadolinu než k protonům, nebo že odhad poloviční maximální koncentrace byl hrubě

zkreslený následkem blokády iontového kanálu gadoliniem. Druhá možnost se zdá být ale méně pravděpodobná, protože Hillův koeficient (= 2.4), jenž byl stanoven na základě koncentračních pokusů, byl v rozumné shodě s hodnotami, které jsme očekávali pro aktivaci TRPV1 receptoru.

Zjištění, že hliník neaktivuje ani nepotencuje membránové proudy procházející TRPV1 kanálem, je v rozporu s myšlenkou, že gadolinium působí podobně jako protony. Rozdílné účinky těchto dvou kationtů by mohly souviset s nižší atomovou hmotností hliníku (26.98) a tudíž větší hydratací jeho obalu oproti gadolinu, které tak může efektivněji než hliník neutralizovat negativně nabitě aminokyselinové zbytky na vnější straně kanálu. Ze stejných důvodů lze očekávat, že gadolinium bude reagovat silněji s negativně nabitými aminokyselinovými zbytky než vápník, který proniká kanálem a má mnohem menší atomovou váhu, přibližně 40.

Aktivační a modulační účinek gadolinia na TRPV1 receptor je zprostředkován pravděpodobně stejnými specifickými místy, na kterých se uplatňuje účinek protonů. Za klíčový je v tomto mechanismu považován glutamát E600. Tyto výsledky však musí být interpretovány opatrně a v kontextu primárních sekvencí, protože je u obou mutantů, E600A a E648A, poškozena schopnost odpovídat na tepelné stimuly. U mutantu E648A jsme zjistili snížené odpovědi vyvolané protony společně s dobře zachovanou potenciací zprostředkovanou protony, což vedlo k závěrům, že tyto dva procesy jsou oddělené a nezávislé (Jordt et al., 2000). Ačkoliv jsme prokázali, že teplem vyvolané odpovědi jsou zvýšené v přítomnosti gadolinia (dokud nepřeváží jeho blokující účinek), nelze rozhodnout, zda gadolinium potencuje teplotní odpovědi, nebo zda teplota zvyšuje gadoliniem vyvolanou aktivitu tohoto mutantu, neboť je těžké od sebe oddělit tyto alosterické efekty.

Blokující účinek gadolinia lze pozorovat i na jiných iontových kanálech. Předpokládá se, že hlavní blokující účinek lanthanidů je způsoben přímým působením na negativně nabitá místa (glutamát a aspartát) v póru kanálu, který je „optimalizován“ k přednostnímu propouštění kladně nabitých iontů. Vaniloidní receptor TRPV1 je neselektivní kationtový kanál s vysokou propustností pro vápník (Caterina et al., 1997) (Tominaga et al., 1998). Kyselé zbytky, E636 a D646, umístěné na vnitřní stěně selektivního filtru nejpravděpodobněji představují body elektrostatických interakcí s pozitivně nabitými ionty, jež kanálem procházejí (Ferrer-Montiel et al., 2004). Vazba gadolinia na negativní místa v póru kanálu spolu s jeho vyšší atomovou hmotností

vysvětlují jak jeho blokující účinek při průchodu kanálem tak pomalý a částečný návrat kanálu z této blokády.

Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites

Karolina Tousova, Ladislav Vyklicky, Klara Susankova, Jan Benedikt, and Viktorie Vlachova*

Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Received 6 January 2005; revised 22 June 2005; accepted 7 July 2005
Available online 15 August 2005

Gadolinium is a recognized blocker of many types of cation channels, including several channels of the transient receptor potential (TRP) superfamily. In this study, we demonstrate that Gd^{3+} , in addition to its blocking effects, activates and potentiates the recombinant vanilloid receptor TRPV1 expressed in HEK293T cells. Whole-cell currents through TRPV1 were induced by Gd^{3+} with a half-maximal activation achieved at 72 μM at +40 mV. Gd^{3+} , at concentrations up to 100 μM , lowered the threshold for heat activation and potentiated the currents induced by capsaicin (1 μM) and low extracellular pH (6). Higher concentrations of Gd^{3+} (>300 μM) blocked the TRPV1 channel. Neutralizations of the two acidic residues, Glu600 and Glu648, which are the key residues conferring the proton-sensitivity to TRPV1, resulted in a loss of Gd^{3+} -induced activation and/or a reduction in its potentiating effects. A trivalent nonlanthanide, Al^{3+} , that possesses much a smaller atomic mass than Gd^{3+} blocked but did not activate or sensitize the TRPV1 channel. These findings indicate that Gd^{3+} activates and potentiates the TRPV1 by neutralizing two specific proton-sensitive sites on the extracellular side of the pore-forming loop. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Gadolinium (Gd^{3+}), a small lanthanide, has been used widely to block various mechanosensitive ion channels (Hamill and McBride, 1996; Cho et al., 2002; Yang and Sachs, 1989). At submillimolar concentrations, Gd^{3+} blocks also various types of calcium (Beedle et al., 2002; Biagi and Enyeart, 1990; Lansman, 1990; Mlinar and Enyeart, 1993), potassium (Elinder and Arhem, 1994; Hongo et al., 1997), sodium (Babinski et al., 2000; Elinder and Arhem, 1994) and nonselective cation (Hase et al., 1995; Cho et al., 2002) channels. The general blocking effect of Gd^{3+} on these channels is presumed to involve a direct interactions with negatively charged sites (Glu and/or Asp) within the channel pore because the ionic radius of trivalent gadolinium (0.938 Å) is similar to monovalent sodium (0.97 Å) and

divalent calcium (0.99 Å) that represent the main current carriers in this type of channels (Lansman, 1990; Mlinar and Enyeart, 1993; Yang and Sachs, 1989). Also, another mechanism has been proposed for inhibition by lanthanides that is based on compelling evidence suggesting that Gd^{3+} , a high-affinity cation, does not block the mechanosensitive channels directly, but instead alters the mechanosensitivity of these channels indirectly by electrostatic effects on the surrounding lipid bilayer (Ermakov et al., 2001; Petersheim and Sun, 1989; Tanaka et al., 2002). The Gd^{3+} -induced lipid condensation may exert positive pressure on the proteins, thus favoring and/or inducing the conformational transitions of the transmembrane domains toward the closed state (Cantor, 1999).

Although the mechanosensitive channels are the most likely proteins that are sensitive to these changes, it would be of interest to establish also whether another class of lipid-embedded proteins, the recently identified transduction channels from the TRPV subfamily that are gated by changes in ambient temperature, might be particularly susceptible to the Gd^{3+} -induced perturbations of the surrounding membrane. We have therefore examined the effects of Gd^{3+} on the vanilloid receptor TRPV1, which represents the best characterized thermally-gated ion channel (Caterina et al., 1997; Gunthorpe et al., 2002; Tominaga et al., 1998). This nonselective cation channel belongs to one of the six protein subclasses comprising the superfamily of transient receptor potential (TRP) channels (TRPV, vanilloid related; TRPC, canonical; TRPP, polycystin; TRPM, melastatin; TRPML, mucopolipins; TRPA, ankyrin-repeat) (Birnbaumer et al., 2003; Clapham, 2003; Montell et al., 2002a,b; Moran et al., 2004). Members of this large protein family have been implicated in a wide variety of physiological processes, ranging from regulation of intracellular Ca^{2+} important for the most vital functions to highly specialized detection of chemical, thermal, mechanical and osmotic stimuli (for review see Benham et al., 2003; Clapham, 2003; Moran et al., 2004). In the peripheral endings of nonmyelinated and thinly myelinated mammalian primary afferents, the TRPV1 channel is a polymodal molecular sensor that responds to multiple pain stimuli including vanilloids, acids (pH <6) and noxious heat (>43°C), the agents that produce burning pain in humans.

The structure of the TRPV1 consists of six putative transmembrane segments and a pore region between segments 5 and 6

* Corresponding author. Fax: +420 29644 2488.

E-mail address: vlachova@biomed.cas.cz (V. Vlachova).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

(Caterina et al., 1997), similar to other TRP channels. The functional TRPV1 channel appears to be assembled from four identical subunits (Jahnel et al., 2001; Kedei et al., 2001). Structure–function studies have recently identified several key domains that contribute to activation and modulation of the TRPV1 receptor (Gavva et al., 2004; Chou et al., 2004; Jordt and Julius, 2002). The cytosolic C-terminal region harbors domains responsible for the interactions with important components of intracellular regulatory processes including calmodulin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding sites and phosphorylation sites for various kinases (Bhave et al., 2003; Jung et al., 2004; Numazaki et al., 2003; Numazaki et al., 2002; Prescott and Julius, 2003). The N-terminal region resides within the cytosol and, typically, contains three ankyrin repeats conserved throughout members of the vanilloid TRPV channel subfamily. On the extracellular side of the TRPV1, two negatively charged amino acid residues, E600 and E648, have been identified to be critical for opening the channel upon neutralization by protons (Jordt et al., 2000; Welch et al., 2000).

The goal of this investigation was to characterize the effects of Gd^{3+} on the vanilloid receptor TRPV1 and to determine the mechanisms by which Gd^{3+} affects this channel. We present evidence that, in addition to its well known blocking effects, Gd^{3+} activates and sensitizes the TRPV1 channel. We also demonstrate that Gd^{3+} appears to act at the same sites as protons and that the specific glutamate residue E600 is particularly important for both activation and potentiation of the TRPV1 channel by Gd^{3+} .

Results

Gd^{3+} induces membrane currents in recombinant TRPV1 receptor

The external application of gadolinium to HEK293T cells in which the rat TRPV1 receptor was transiently expressed elicited marked current responses at room temperature (Fig. 1A). These were not observed in either the wild-type or in mock-transfected HEK293T cells (Fig. 1E). Ruthenium red at a concentration of 10 μ M almost completely blocked inward currents induced by 300 μ M gadolinium at -70 mV and at 25°C ($93 \pm 1\%$; $n = 4$), while capsaizine at a concentration of 10 μ M inhibited these currents only by $38 \pm 3\%$ ($n = 3$; Fig. 1D). To determine the full effectiveness of gadolinium activation of the TRPV1 receptor, the magnitudes of the Gd^{3+} -induced current were related to those of the proton-gated currents with an external pH of 5 (Figs. 1B and C). At a holding potential of -70 mV, the currents induced by 10 μ M Gd^{3+} were well above threshold with a mean current density of -3.5 ± 1.1 pA/pF ($n = 14$).

Whereas at a holding potential of $+40$ mV half-maximal activation (EC_{50}) was achieved at 72 ± 23 μ M (Hill coefficient = 1.2 ± 0.2 ; $n = 8$), the EC_{50} could not be accurately assessed at -70 mV because the Gd^{3+} -induced currents were not saturated at higher concentrations ($n = 17$). While gadolinium at concentrations of 10–300 μ M appeared to activate the TRPV1 receptor in a dose-dependent manner, the responses at higher concentrations (>300 μ M) of Gd^{3+} were diminished. This diminution was substantially reduced at positive potentials (Figs. 1B and C). Prolonged or repeated activation of TRPV1 by higher concentrations of gadolinium resulted in the desensitization of the whole-cell currents (Figs. 1Aa and Ab). The activation kinetics of the membrane currents

induced by pH 5 and 1 mM Gd^{3+} were similarly fast (Fig. 1Ac). The time course of deactivation at 100 μ M Gd upon washout was quite reproducible with double exponential fits yielding two deactivation time constants of 220 ± 58 ms (56%) and 1.6 ± 0.4 s ($n = 7$). However, at higher concentrations (300 and 1000 μ M) and upon prolonged stimulation, the deactivation process was rather complex and variable among the cells.

These findings, together with the close correlation between the peak amplitudes of the responses induced by 1 mM Gd^{3+} and pH 5 ($r = 0.77$; $n = 10$, $P < 0.01$, Spearman's rank correlation), might suggest that similar mechanisms are involved in gating the TRPV1 channel by low pH and Gd^{3+} . Further, the data suggest that, at higher concentrations (>300 μ M), gadolinium may block the TRPV1 channel.

The effects of Gd^{3+} on TRPV1-mediated membrane currents induced by noxious heat

The TRPV1 channel can be activated by noxious heat with a threshold of about 43°C (Caterina et al., 1997). Given the evident parallels between Gd^{3+} and proton-mediated activation of TRPV1, we investigated the effects of gadolinium on the heat-induced membrane currents induced by 3 s ramps of increasing temperature to 46°C (Fig. 2). At room temperature, gadolinium (100 μ M) evoked a membrane current of 1.7 nA (Fig. 2Ab). In the innocuous range $<35^\circ\text{C}$, this current increased linearly with increasing temperature. At higher temperatures, however, the slope of the current-temperature relation decreased gradually suggesting the presence of an equilibrium between the channel activation and block (see graphs a and b of the current-temperature relationships in Fig. 2B). The block of the heat-induced currents by Gd^{3+} was striking when the concentration was increased to 1 mM (Figs. 2Ad and Bd). The effects of Gd^{3+} were only partially reversible, suggesting that a significant proportion of channels remained blocked after washing the cell with control solution; nevertheless, the heat sensitivity of the channels retained the typical nonlinear characteristics (Figs. 2A and B, c and e). When the control responses induced by heat were normalized, there was either no significant shift of the temperature threshold or the threshold was reduced upon repetitive heat stimulation.

To determine the extent to which the observed effects of Gd^{3+} on the heat responses depend on extracellular calcium, the Ca^{2+} was replaced by equimolar gadolinium during the heat stimulation. Native and heterologously expressed TRPV1 channels are spontaneously active in the extracellular solution which is nominally free of calcium (Vyklícký et al., 1999) although the underlying mechanism for such mode of activation has not been fully elucidated. Application of nominally Ca^{2+} -free extracellular solution at -70 mV produced a significant inward membrane current (0.8 ± 0.3 nA; $n = 8$, measured after 5 s of application) that increased linearly with an elevation of temperature (Fig. 2Ca). A substantial proportion of the elevated current remained at a fairly stable plateau following a decrease in temperature to 25°C until the control bath solution with 1 mM Ca^{2+} was restored (Fig. 2Cb). In the Ca^{2+} -free extracellular solution, gadolinium at a concentration of 1 mM induced a rapidly activating current with a mean peak amplitude of 2.4 ± 0.5 nA ($n = 12$) at room temperature. This current decreased slightly when the temperature was elevated from $\sim 35^\circ\text{C}$ to 47°C suggesting that the heat induced current was virtually blocked by gadolinium (Figs. 2Cc and Dc). After 1 min washout, the recovery from the gadolinium

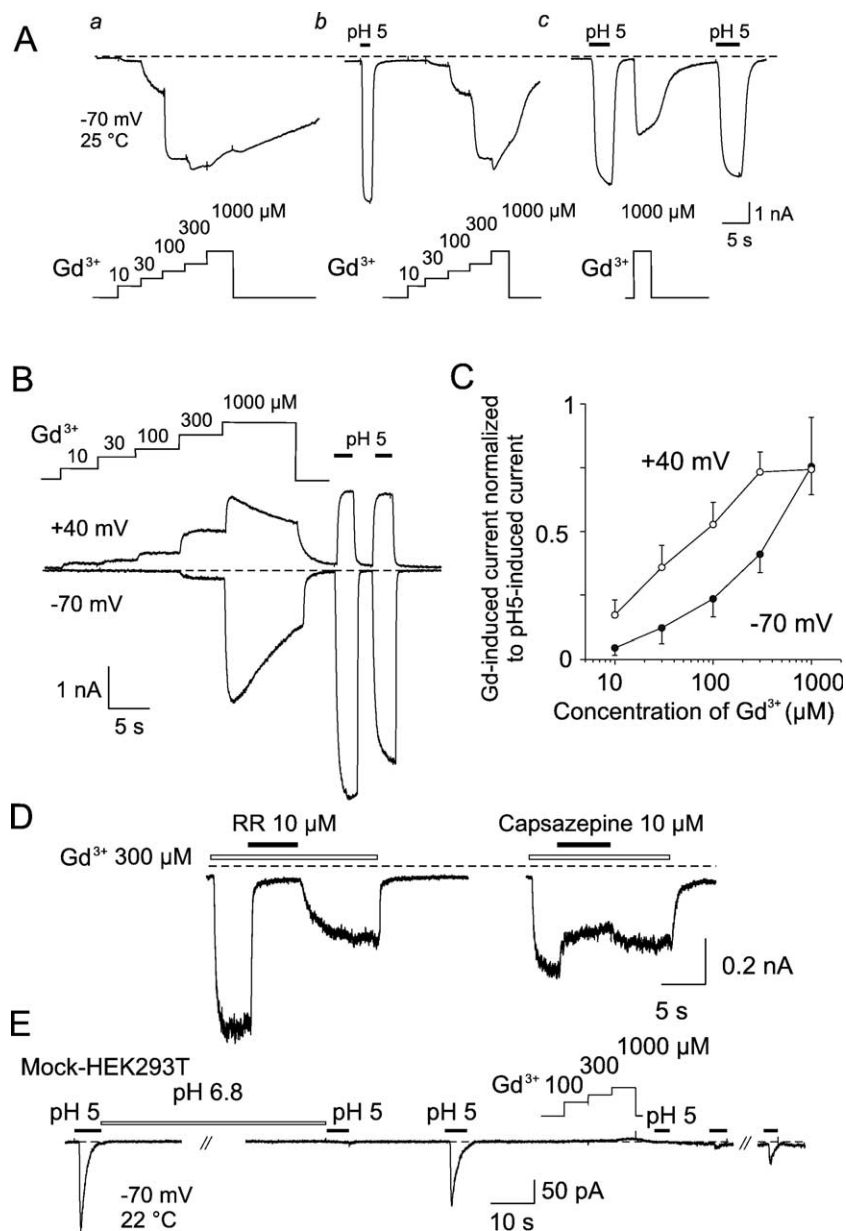


Fig. 1. Gadolinium activates TRPV1 at room temperature. (A) Whole-cell current responses were evoked by Gd³⁺ in HEK293T cells transiently expressing the rat TRPV1 channel. The application protocols for Gd³⁺ are indicated below the current traces. (b) To compare current magnitudes, channels were first activated for 2 to 4 s by acidic solution (pH 5; indicated by the bars above the records). Desensitization produced by repeated Gd³⁺ application shifted the threshold for Gd³⁺ activation to higher concentrations. (a) In the first trial, 10 μM Gd³⁺ was sufficient to induce a significant current, while a concentration of 30 μM was needed to induce a similar response in the second trial (b). Dashed line indicates zero current level. (B) The effects of Gd³⁺ were concentration and voltage dependent. The pulse protocols for Gd³⁺ and pH 5 are indicated above the current traces. (C) Dose–response curves for activation of TRPV1 by Gd³⁺ at negative (–70 mV, solid circles) and positive (+40 mV, open circles) membrane potentials. Responses were normalized to the pH 5-activated steady state currents. Each data point represents the mean ± SEM with the number of cells from 10 to 17 for –70 mV and from 4 to 12 for +40 mV. (D) Ruthenium red (RR) at a concentration of 10 μM blocked inward currents induced by 300 μM gadolinium, while capsazepine at a concentration of 10 μM inhibited these currents only by 38%. (E) Mock-transfected HEK293T cells transfected with the pQBI 25-GFP vector did not respond to Gd³⁺ up to a concentration of 1 mM. A significant proportion of the cells responded to extracellularly applied pH 5 with inactivating inward currents that were attributable to the endogenous proton-gated conductance mediated by native ASIC channels (Gunthorpe et al., 2001). The fast inactivating currents induced by pH 5 were inhibited by a prolonged extracellular application of pH 6.8. Note that a similar desensitization of ASIC-mediated currents was achieved also by application of gadolinium.

blockade was similarly incomplete when gadolinium was applied in the absence (37 ± 11%; n = 5) or presence (54 ± 9%; n = 7) of external 1 mM Ca²⁺ (*t* test, *P* = 0.272; Fig. 2E). Thus, it seems likely that Gd³⁺ does not utilize a calcium-dependent mechanism to block the TRPV1-mediated heat induced currents.

Interaction of Gd³⁺ with protons and capsaicin

To investigate the site of action and the mechanisms by which gadolinium activates and/or modulates TRPV1 more closely, dose–response curves for Gd³⁺ activation were gen-

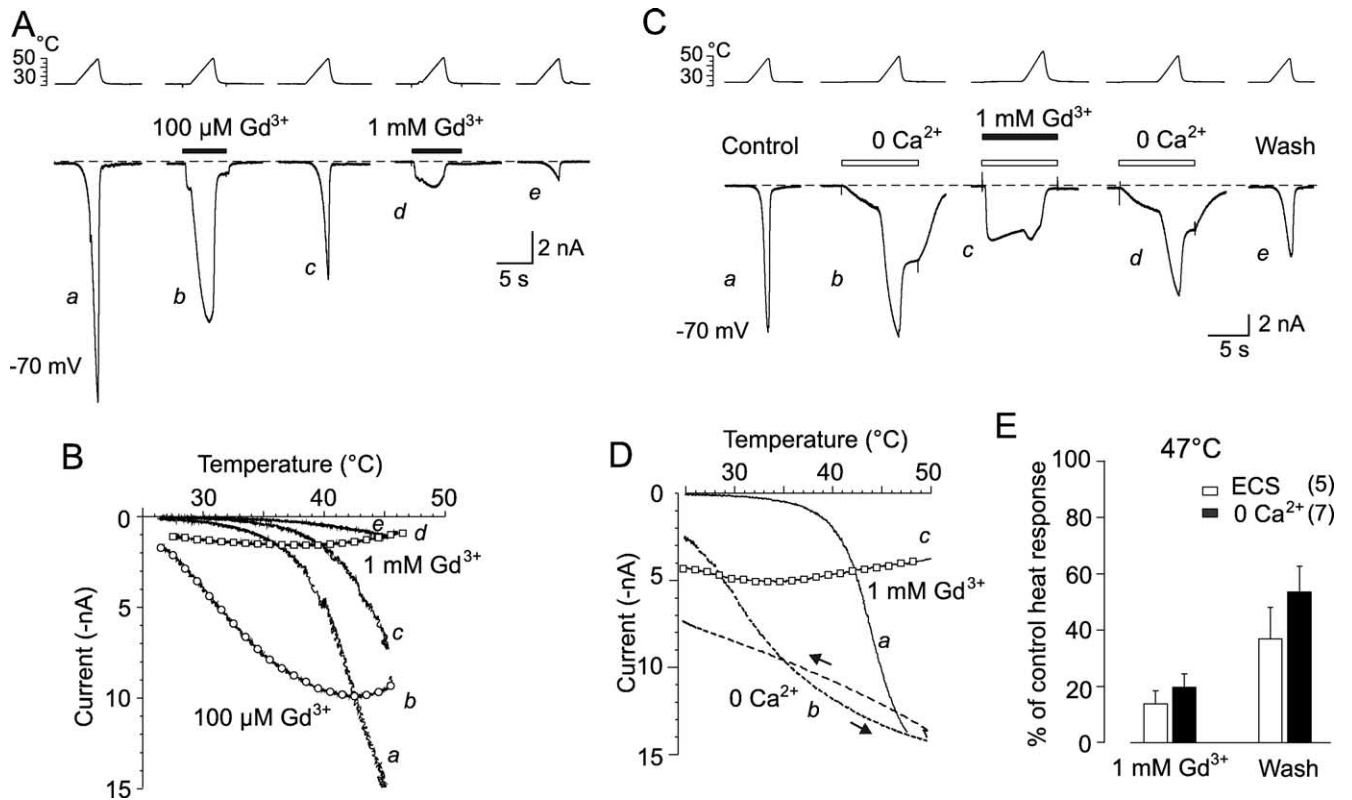


Fig. 2. Modulation of TRPV1-mediated heat-induced currents by Gd^{3+} . (A) Whole-cell membrane currents induced by 3 s ramps of heated solutions to $47^{\circ}C$ in (a) control extracellular solution (ECS), (b) in the presence of $100 \mu M Gd^{3+}$, (c) wash, (d) in the presence of Gd^{3+} 1 mM and (e) wash. The upper row of the records shows the temperatures of the superfusing solutions measured with a thermocouple inserted in the common outlet capillary of the drug application system. Dashed line represents zero current level. The bars above the records indicate the duration of the drug application. (B) Comparison of the temperature–current relationships for control extracellular solution (a, c, e; solid lines) and for current induced by heat in the presence of $100 \mu M Gd^{3+}$ (open circles) and 1 mM Gd^{3+} (open squares). (C) The effects of 1 mM Gd^{3+} on the heat responses induced in nominally Ca^{2+} -free ECS. Solutions were applied either separately or in combinations as indicated. (D) Superimposed current responses induced by heat in control ECS (solid line), in nominally Ca^{2+} -free ECS (dashed line) and in the presence of 1 mM Gd^{3+} (open squares) are plotted against temperature. Note a marked hysteresis on cooling to $25^{\circ}C$ (arrows, the trace b). (E) Percentage inhibition of the heat-induced inward currents achieved by 1 mM Gd^{3+} measured at $47^{\circ}C$ in control ECS and in nominally Ca^{2+} -free ECS. The amplitudes of the responses recorded in control solution 1 min later were used as a measure of recovery from Gd^{3+} block (Wash). Numbers of cells examined are indicated in brackets.

erated by measuring the peak currents elicited by increasing concentrations of Gd^{3+} in an extracellular solution buffered at pH 6.

Protons at pH 6 evoked inward currents at room temperature (Fig. 3A), a significant proportion of which was attributable to the endogenous proton-gated conductance mediated by native acid

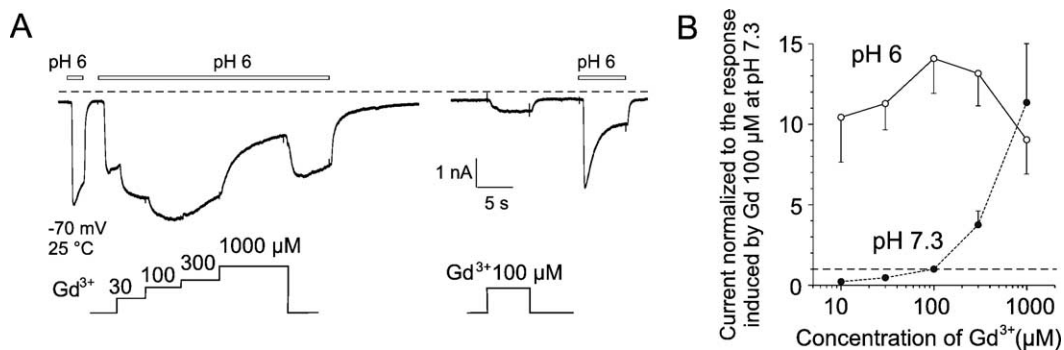


Fig. 3. Interaction of Gd^{3+} with proton-induced currents in TRPV1. (A) Whole-cell patch-clamp recordings from TRPV1-expressing HEK293T cell stimulated consecutively with increasing concentrations of Gd^{3+} at pH 6. The application protocols for Gd^{3+} are indicated below the current traces. To obtain information on the extent of TRPV1 desensitization and the proportion of the undesirable endogenous proton-gated conductance mediated by native ASIC channels, the cells were exposed first to acidic solution (pH 6; indicated by the bars above the records) followed by consecutive applications of increasing concentrations of Gd^{3+} in combination with acidic solution (pH 6). (B) The dose–response curve for Gd^{3+} activation derived at pH 6 from 14 independent cells is compared with the shape of the concentration–response curve obtained at pH 7.3. The peak amplitudes were normalized to the amplitudes of the currents induced by $100 \mu M Gd^{3+}$ recorded at pH 7.3 in the same cell.

sensing ion channels (ASIC) channels expressed in the HEK293 cells (Gunthorpe et al., 2001) (see the last two responses to pH 6 in Fig. 3A). In our experiments, the transient endogenous ASIC currents were inhibited selectively by repeating the application of pH 6, followed by consecutive applications of increasing concentrations of Gd^{3+} in acidic solution (pH 6). The peak amplitudes were normalized to the amplitudes of the currents induced by 100 μM Gd^{3+} recorded at pH 7.3 in the same cell. The dose–response curves of 14 independent cells are compared with the concentration–response curve obtained at pH 7.3 in Fig. 3B. Because of the concomitant block by higher concentrations, we were unable to obtain a more accurate estimate of the EC_{50} and Hill coefficient for Gd^{3+} . However, at least qualitatively, the $\log(Gd^{3+})$ –response curve was strongly affected by reducing pH, which indicates that the interactions of extracellular protons and Gd^{3+} with the channel are not mutually exclusive or independent.

Based on these results together with the above findings that low concentrations (<100 μM) of Gd^{3+} sensitize the membrane currents induced by noxious heat, we hypothesized that gadolinium, apart from activating the channel, might also be capable of sensitizing the TRPV1 receptor in a manner analogous to proton-mediated potentiation. This may be a consequence of the interaction of Gd^{3+} with the specific negatively charged amino acid residues on the extracellular surface of the channel protein (Jordt et al., 2000). We therefore examined the effects of Gd^{3+} on capsaicin-induced responses, and indeed, at a concentration of 100 μM , we found that gadolinium strongly potentiated the responses induced by 1 μM capsaicin ($264 \pm 78\%$; $n = 16$). The increase in capsaicin response produced by 100 μM Gd^{3+} was greater than the additive currents evoked by capsaicin and gadolinium 100 μM alone recorded before the administration of capsaicin or after 1-min washout (Figs. 4A and D). At a concentration of 1000 μM , Gd^{3+} inhibited the capsaicin-induced responses to $36 \pm 6\%$ in 8 cells investigated. From these experiments, it is evident that Gd^{3+} appears to serve as both a direct activator and a potent modulator of TRPV1.

Lack of the facilitatory effects of Gd^{3+} on TRPV1 mutants E600A and E648A

Two negatively charged amino acid residues located on the extracellular side of the receptor, E600 and E648, have been shown to determine the sensitivity of TRPV1 to acids (Jordt et al., 2000). The results described above may indicate that gadolinium, as a trivalent cation, could also neutralize these extracellular glutamate residues similarly to protons. Having been prompted by the findings of Jordt et al. (2000), we therefore sought to characterize the effects of gadolinium in two proton-insensitive single point mutants of TRPV1 that contained the neutral amino acid alanine at either position 600 or 648 (Figs. 4B–F). E600A-transfected cells were generally much less responsive and less stable during the recordings than the wild type, which indicates a potential deleterious effect of the mutation on cell viability. Both mutant channels showed differing sensitivities to protons. The proton (pH 5)-activated responses of the E648A mutant were reduced significantly, while the responses were practically abolished by the mutation of E600 to alanine. The mean ratios of currents induced by pH 5 to currents activated by 1 μM capsaicin were $26 \pm 5\%$ for the E648A mutant ($n = 21$) and $101 \pm 14\%$ ($n = 8$) for the wild-type channel. The responses of both mutant channels to 1 μM capsaicin were decreased substantially as were also the currents induced by heat (>43°C), when compared to wild-type TRPV1 (Fig. 4E). The differences between the responses of wild-

type, E600A and E648A to capsaicin, however, were not significant when expressed in terms of current densities (one-way ANOVA at the 0.05 level, $P = 0.235$; $n = 15, 6$ and 21 for WT, E600A and E648A, respectively). In contrast, the reductions in heat responsiveness were highly significant (Fig. 4E, right bar graph, $P < 0.001$; $n = 6$ for each channel phenotype, with two to four independent transfections).

To test whether the glutamates at positions 600 and 648, as replaced in the mutants, are indeed involved in Gd^{3+} -mediated activation and/or modulation of TRPV1 channel, a 5 s application of 1 μM capsaicin was followed by superfusion of the cells with capsaicin together with Gd^{3+} at concentrations of 100 and 1000 μM . These concentrations and exposure durations were sufficient to reveal the most striking functional differences between the wild-type and mutant channels (see bar graph of Fig. 4D). In clear contrast to the observations made for wild-type TRPV1 (see Fig. 4A), the capsaicin-induced currents were reduced to $53 \pm 5\%$ by 100 μM Gd^{3+} ($n = 8$) in the E600A mutant (Fig. 4B). Gadolinium did not exhibit any agonistic activity for the E600A mutant channel and, at concentrations from 30 μM to 1 mM, blocked the heat-induced responses. On the other hand, mutation at the E648 site disrupted the ability of Gd^{3+} to sensitize the capsaicin-induced currents, yet this mutant retained the ability to respond to Gd^{3+} . The capsaicin-induced and heat-induced whole-cell currents were blocked by 1 mM gadolinium at -70 mV in this mutant channel phenotype (Fig. 4C). At room temperature, the capsaicin-induced currents were blocked to $46 \pm 8\%$ by 1 mM Gd^{3+} ($n = 5$) in the E648A mutant, which reduction was slightly but not significantly more than the block of the wild type ($31 \pm 5\%$; $n = 7$, $P = 0.146$). These observations led us to believe that both glutamate residues are directly involved in regulating the sensitivity of TRPV1 to gadolinium. While the glutamate at position 600 is critical for both activation and modulation of TRPV1 by Gd^{3+} , the glutamate in E648 seems to regulate the Gd^{3+} -mediated potentiation of the capsaicin-evoked channel gating. This hypothesis was supported further by the results of the dose–response experiments performed on the E648A mutant channel (Fig. 4F). Using a protocol similar to that in Fig. 1A, concentration–response data were constructed by normalizing the Gd^{3+} -induced responses to the responses induced by pH 5 in the same cell. Thus, we were able to compare the Gd^{3+} affinities for both the wild-type and E648A receptors. Replacing the glutamate E648 shifted the position of the $\log(Gd^{3+})$ –response curve to the right (Fig. 4F) corresponding to a decrease in the apparent affinity of the E648A mutant channel for Gd^{3+} .

Al^{3+} blocks but does not activate the TRPV1 receptor channel

To determine the extent to which the atomic mass of gadolinium is responsible for its effects on TRPV1 receptor, we tested a nonlanthanide aluminium, a trivalent metal cation of much lower atomic mass (26.98) than gadolinium (167.25). Al^{3+} (30 or 100 μM) did not produce any membrane currents when applied to the recombinant TRPV1 receptor at room temperature (Fig. 5). At 30 μM , Al^{3+} did not exert a significant effect on the membrane currents induced by 1 μM capsaicin ($99 \pm 4\%$; $n = 8$); however, at 100 μM , it reversibly inhibited these responses to $40 \pm 6\%$ at -70 mV ($n = 8$) and to $73 \pm 7\%$ at $+40$ mV ($n = 4$) indicating a voltage dependent block. These results suggest that the trivalent cation Al^{3+} blocks the TRPV1 channel at concentrations comparable to Gd^{3+} . In contrast to Gd^{3+} , the TRPV1 was neither activated nor sensitized by Al^{3+} .

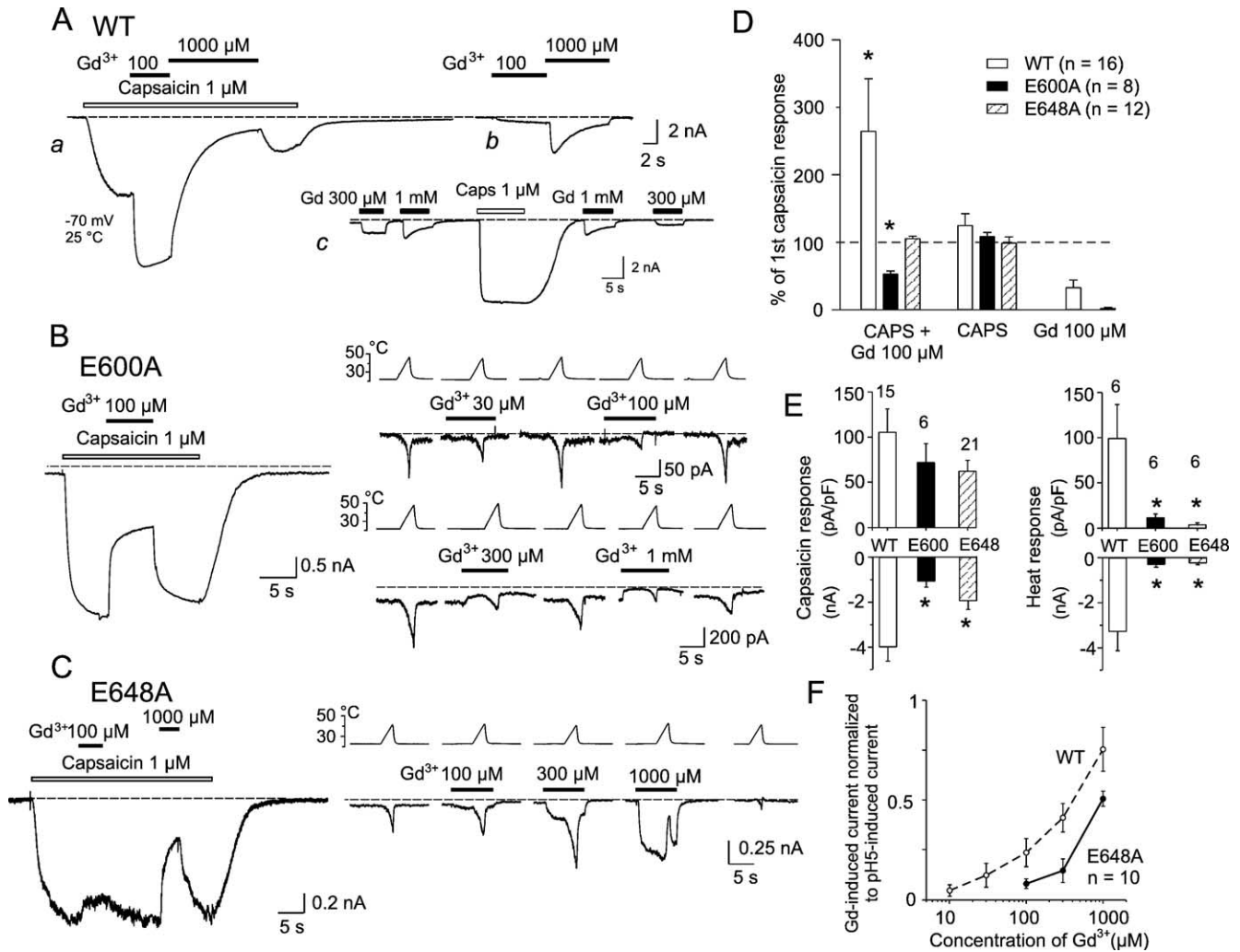


Fig. 4. Mutations in E600 and E648 confer loss of Gd^{3+} -induced sensitization and/or activation of TRPV1. (A, a), Representative whole-cell responses recorded from a HEK293T cell expressing the wild-type TRPV1 receptor induced by application of 1 μ M capsaicin, followed by capsaicin together with 100 μ M and 1 mM Gd^{3+} . (b) Responses to Gd^{3+} at 100 μ M and 1 mM were recorded from the same cell 1 min later at a holding potential of -70 mV. (c) Application of capsaicin (1 μ M, 8 s) did not cause any significant change in the responsiveness of TRPV1 to Gd^{3+} 300 μ M and 1 mM in another cell. Currents were recorded at room temperature. (B) Effects of Gd^{3+} on E600A mutant. Gd^{3+} at 100 μ M blocked the capsaicin-induced currents reversibly (left). In another two cells, Gd^{3+} at 30, 100, 300 and 1000 μ M blocked the heat-induced responses without any activating effects (right). (C) Effects of Gd^{3+} on E648A mutant. Gd^{3+} , applied in combination with capsaicin, did not influence the capsaicin-induced responses at 100 μ M significantly and blocked the currents at 1000 μ M reversibly (left). At 100, 300 and 1000 μ M, Gd^{3+} activated inward currents in another cell expressing the E648A mutant and the responses were increased by increases in temperature until the block at a high concentration of Gd^{3+} (1 mM) and at higher temperatures ($>39^{\circ}C$) became predominant (right). (D) Bar graph showing the average effects of 100 μ M Gd^{3+} on capsaicin responses in wild-type, E600A and E648A channel. The reversibilities of the Gd^{3+} effects are given for each channel phenotype (CAPS). The numbers of cells are given in the legend. Asterisks indicate values significantly different from the amplitude of the preceding capsaicin response, $P < 0.05$. For comparison, the average relative responses induced by 100 μ M Gd^{3+} alone are shown for wild-type and for E648A mutant. (E) Bar graphs showing average capsaicin-evoked (left) and heat-evoked currents (right) in wild-type, E600A and E648A mutants. Lower bars show average absolute amplitudes of the currents. Upper bars show the mean current densities. The numbers above the bars represent the number of cells. Asterisks indicate values significantly different from wild type, $P < 0.01$. (F) Dose–response curve for activation of E648A mutant by Gd^{3+} at negative (-70 mV) membrane potential. Data are compared with the shape of the concentration–response curve obtained for the wild-type. Responses were normalized to pH 5-activated steady state currents recorded from the same cell. Each data point represents the mean \pm SEM derived from 10 independent cells.

TRPV3, the homologue of the vanilloid receptor subtype 1, is blocked but not activated by gadolinium

Given the high degree of homology of the TRPV1 receptor to other TRPV family members, we were interested in examining gadolinium effects on a related thermosensitive channel TRPV3. A comparison of the sequences for the putative pore regions of the rat TRPV1 and the human TRPV3 revealed a conserved glutamate residue at position 610 corresponding to E600 in TRPV1, while an

asparagine residue was found at position 643 corresponding to E648 (Fig. 6A). In HEK293T cells transiently transfected with human TRPV3, we first examined the effects of 10 μ M, 100 μ M and 1 mM gadolinium on inward currents induced by 100 μ M 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), a compound that is a common activator of TRPV1 and TRPV3 channels (Hu et al., 2004). At $25^{\circ}C$, the 2-APB induced currents were blocked almost completely by extracellular Gd^{3+} (by $92 \pm 2\%$ at 1 mM Gd^{3+} ; $n = 11$) and recovered rapidly after Gd^{3+} washout (Fig. 6B).

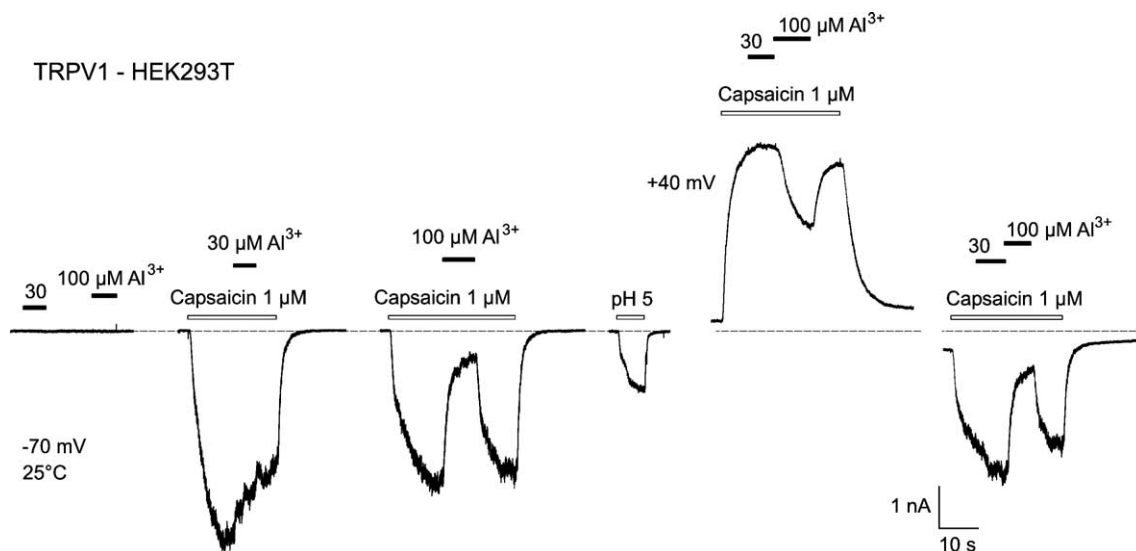


Fig. 5. Aluminium neither activates TRPV1 receptor nor sensitizes responses to capsaicin. Representative currents recorded sequentially from a HEK293T cell transiently expressing the wild-type TRPV1 receptor. The nonlanthanide trivalent metal cation aluminium (atomic mass 26.98) did not activate TRPV1. Al^{3+} at 30 μM did not exert significant effects on the membrane currents induced by 1 μM capsaicin. At 100 μM , Al^{3+} inhibited the capsaicin responses reversibly and in a voltage-dependent manner. Capsaicin and Al^{3+} were applied either separately or in combinations as indicated. Holding potential was -70 mV or $+40$ mV (shown next to the records). All traces were recorded from the same cell.

Temperature is another common activator of TRPV1 and TRPV3 channels; however, the TRPV3 is activated at lower temperatures than TRPV1 (~ 33 – 39°C ; Peier et al., 2002; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002). The thermally induced currents in HEK cells expressing TRPV3 were influenced more strongly by the presence of external Ca^{2+} than those in TRPV1-transfected cells (Peier et al., 2002). In the presence of 1 mM Ca^{2+} in the extracellular solution, the temperature gated currents have a slow rise time and are generally of small amplitude (158 ± 45 pA at -70 mV; $n = 5$). We therefore used a Ca^{2+} -free extracellular solution to test the effects of Gd^{3+} on the temperature gated membrane currents which amplitudes were 4 to 5 times larger than those in the Ca^{2+} containing extracellular solution. To activate TRPV3, we applied rapid step changes in temperature using the perfusion technique that allows the application of temperature changes at maximum rates of $\sim 60^\circ\text{C}/\text{s}$ within a range of 5 – 60°C . At a holding potential of -70 mV, heating the control Ca^{2+} -free solution from 25°C to 49°C activated an inward currents with the threshold of $\sim 40^\circ\text{C}$ (Figs. 6C and D). This value was greater than the temperature threshold for activation of TRPV3 reported by other authors (Peier et al., 2002; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002). Since our focus was on the effect of gadolinium on TRPV3, we did not pursue any further study on this interesting observation. The heat induced currents were blocked reversibly in the presence of 1 mM Gd^{3+} .

These data indicate that gadolinium neither activates nor sensitizes the TRPV3 receptor, but it blocks both the chemical and thermal activation modes of this channel, similarly to many previously described results on various other cationic channels.

Discussion

The results from this study demonstrate that gadolinium exerts three distinct effects on the recombinant rat vanilloid TRPV1 receptor. First, Gd^{3+} activates the channel by interacting with the negatively charged amino acid residue E600 located on the

receptor extracellular side. Second, Gd^{3+} potentiates the TRPV1-mediated responses induced by heat and capsaicin in a manner similar to protons. The ability of Gd^{3+} to potentiate the capsaicin induced responses is regulated by a glutamate at position 648, a second acidic extracellular residue which has been shown to play an important role in regulating the sensitivity of TRPV1 to acids (Jordt et al., 2000). Third, the results strongly suggest that Gd^{3+} blocks the TRPV1 channel when passing through the channel pore as a charge carrier. The first two but not the latter effects can be abolished completely by a point mutation E600A.

Activation of TRPV1

Gd^{3+} activates the TRPV1 channel at room temperature but it is difficult to characterize this activation pharmacologically based upon dose response studies; this is apparently due to the concomitant blocking effects at higher concentrations. The pH_{50} for proton activation of the TRPV1 in HEK293 cells has been estimated to be at 5.4 at 22°C (Tominaga et al., 1998). We found that the minimum concentration of Gd^{3+} to activate TRPV1 at room temperature was between 10 and 30 μM . This concentration is more than one order of magnitude higher than that necessary to produce a similar effect by protons, which suggests that either the receptor has a lower apparent affinity for gadolinium than for protons or that the estimates of the half-maximal concentration were biased due to the blocking action of Gd^{3+} .

The finding that another trivalent cation, Al^{3+} , neither activates nor potentiates membrane currents in TRPV1 channel might seem to be in disagreement with the simple idea that the three positive charges of gadolinium may substitute for protons. A possible explanation for the difference between the effects of Al^{3+} and Gd^{3+} might be their quite different atomic masses which are 26.98 and 157.25. Therefore, it can be expected that the hydration shell of Al^{3+} may be larger than that of Gd^{3+} (Hille, 2001) and consequently, Gd^{3+} may neutralize the negative amino acid residues on the extracellular side of the receptor more effectively

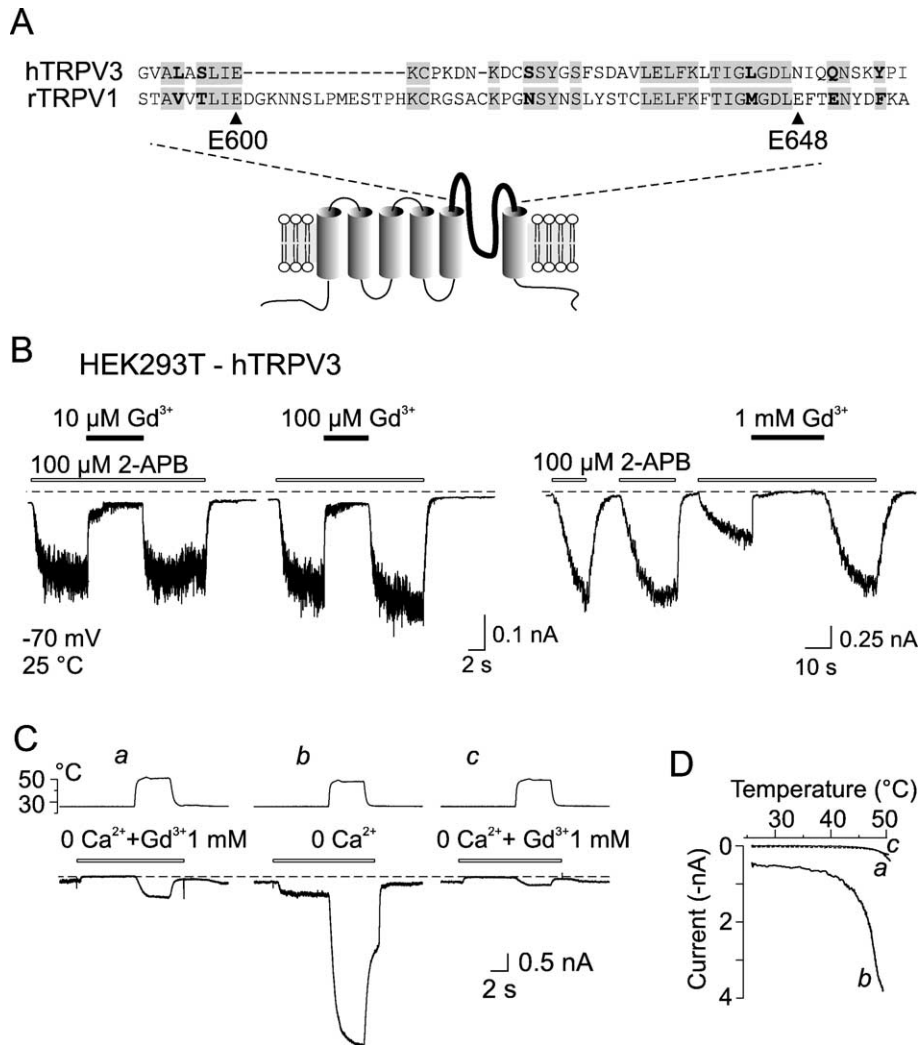


Fig. 6. Effects of Gd^{3+} on TRPV3-mediated whole-cell currents induced by 2-APB and temperature. (A) Amino acid sequence alignment of the putative pore region for the rat TRPV1 (GeneBank accession number AAC53398) and human TRPV3 (AAM54027) channel. Glutamates at positions 600 and 648, corresponding to glutamate and asparagine at positions 610 and 643 in TRPV3, are indicated by arrows. Gray shading; identical or similar amino acids. Similar amino acids are in bold type. (B) TRPV3-expressing HEK293T cells were exposed to 100 μM 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) at room temperature. The agonist 2-APB was applied either separately or in combination with 10 μM , 100 μM and 1 mM Gd^{3+} as indicated. Holding potential was -70 mV. (C) The effects of 1 mM Gd^{3+} on thermal responses induced in nominally Ca^{2+} -free ECS. The upper row of the records shows the temperature of the superfusing solutions. Dashed line represents zero current level. Left, right, Gd^{3+} in Ca^{2+} -free ECS. Middle, TRPV3 channels were activated in response to temperature shifts from room temperature to 50°C in Ca^{2+} -free solution. Note a marked reduction in the baseline noise and in the leakage after the application of Gd^{3+} in labels a and c. (D) Superimposed current responses induced by heat in control Ca^{2+} -free ECS (b) and in the presence of 1 mM Gd^{3+} (solid and dashed lines, a and c) are plotted against temperature.

than does Al^{3+} . For the same reason, it can be expected that Gd^{3+} interacts with the negatively charged amino acid residues in the channel pore more strongly than does Ca^{2+} which permeates through TRPV1 and possesses a much smaller atomic mass, ~ 40 . The binding to the negatively charged residues in the pore and the large size can also explain why Gd^{3+} is prone to block the channel when passing through it and predicts that Gd^{3+} enters the channel much faster than it is released. This may also explain why the blocking effects of gadolinium are reversed only slowly and partially (see Fig. 1).

Our results demonstrate clearly that the glutamate residue at position 600 is the key negative amino acid responsible for the activation and potentiation produced by Gd^{3+} at TRPV1 receptor. However, these results must be interpreted cautiously and in the

context of the primary sequence, because the ability of both mutants, E600A and E648A, to respond to thermal stimuli is impaired (see Fig. 4E). The results for TRPV3, a vanilloid receptor TRPV1 homologue that has been demonstrated previously to be insensitive to protons (Peier et al., 2002; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002), indicate that the presence of glutamate at position 610, corresponding to E600 in TRPV1, is not sufficient to confer the Gd^{3+} sensitivity to TRPV3 (see Fig. 6). Other study (Suzuki et al., 1999) has demonstrated that the mechanoresponsive stretch-inhibitable channel, a TRPV1 receptor variant, is insensitive to protons and is blocked only by Gd^{3+} despite the fact that this channel shares a common amino acid sequence with TRPV1 (from Y309 to V686) including an identical putative pore region.

Potentiation of TRPV1

Gd³⁺ activates and modulates the TRPV1 receptor probably through the same specific sites as protons. The reduced proton-evoked responses, together with the well preserved proton-mediated potentiation of thermal responses found in the E648A mutant, have led to the conclusion that these two processes are separate and independent (Jordt et al., 2000). Although we demonstrate here that thermal responses of the E648A mutant are increased in the presence of Gd³⁺ (until the blocking effect of Gd³⁺ prevails), we cannot decide whether Gd³⁺ potentiates the thermal responses or whether temperature increases the Gd³⁺-induced activity of this mutant since it is difficult to separate these allosteric effects into components. In any case, the data unequivocally indicate that the glutamate residue at position 648 is involved in potentiation of capsaicin-induced responses.

From our data, it seems likely that mutating the glutamate E648 also decreased the apparent affinity of the channel for Gd³⁺ (see Fig. 4F). Furthermore, by normalizing the magnitudes of the inward currents induced by increasing concentrations of Gd³⁺ to the preceding pH 5-induced response, we demonstrated a connection between these two activation mechanisms. If gadolinium and protons activated the channel independently, then the Gd³⁺-induced currents should be relatively bigger since the E648A mutant exhibits a strong reduction in proton-activated currents (four times when compared relative to capsaicin-induced responses). This is in contrast to what was observed in our experiments.

Blockade of TRPV1 by Gd³⁺

Gadolinium, a small lanthanide, is a well recognized blocker of many types of mechanosensitive cation channels. At submillimolar concentrations, Gd³⁺ blocks the nonselective mechano-gated channels (see Hamill and McBride, 1996) and various Ca²⁺ permeable channels (Beedle et al., 2002; Biagi and Enyeart, 1990; Hille, 2001; Lansman, 1990; Mlinar and Enyeart, 1993). According to the concentration range needed for complete inhibition, gadolinium is also commonly used to differentiate among the members of canonical transient receptor potential (TRPC) channel subfamily (Halaszovich et al., 2000; Kamouchi et al., 1999; Trebak et al., 2002; Zhu et al., 1998). The general blocking effect of lanthanides is presumed to involve a direct interaction with negatively charged sites (Glu and/or Asp) in the channel pore that is inherently optimized to favor the entrance of positively charged ions. The vanilloid receptor TRPV1 is a nonselective cation channel with the highest permeability for Ca²⁺ (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). The acidic residues, E636 and D646, positioned at the inner wall of the selectivity filter most likely represent the points of electrostatic interaction with positively charged ions passing through the pore (Ferrer-Montiel et al., 2004). This is also a likely explanation why the trivalent cation Gd³⁺ exerts an inhibitory effect on this channel.

The high affinity binding of lanthanides has been shown to affect the physical properties of phospholipid bilayers strongly by causing membrane rigidification, an increase of membrane tension and a decrease of transversal compliance (Ermakov et al., 2001; Verstraeten et al., 1997). Despite a close relationship of TRPV1 to two osmotically activated ion channels, TRPV4 (Liedtke et al., 2000) and SIC (Suzuki et al., 1999), this channel does not seem to respond to mechanical stimuli (Cho et al., 2002; Liedtke et al., 2000). In agreement with other studies (e.g. Dunina-Barkovskaya

et al., 2004), we frequently observed that application of Gd³⁺ improved the gigaseal of the cell under study. Although we cannot rule out completely some contribution of the membrane-borne electrostatic effects, a direct interaction of Gd³⁺ with negatively charged sites in the TRPV1 channel pore is a more plausible explanation for the blocking mechanism.

Effects of Gd³⁺ on other TRP channels

Dual effects of lanthanides, potentiating and blocking, were reported recently in two other members of the mammalian TRP channel superfamily, TRPC4 and TRPC5; these receptors belong to the canonical or classical (TRPC) channel subfamily, and the currents carried through these channels have been shown to be potentiated by submillimolar concentrations of La³⁺ or Gd³⁺ (Jung et al., 2003; Schaefer et al., 2000, 2002; Strubing et al., 2001), whereas millimolar concentrations were inhibitory. Similar to our present findings on TRPV1, neutralization of two negatively sites situated close to the extracellular mouth of the TRPC5 channel pore resulted in a loss of the potentiation (Jung et al., 2003). These authors also found that Gd³⁺ competes with Ca²⁺ for these two sites (Glu543 and Glu595/Glu598), thus altering the potentiating effect of Ca²⁺. In contrast, our experiments on TRPV1 in which Gd³⁺ replaced Ca²⁺ in the extracellular solution, did not reveal significant changes in the Gd³⁺ inhibitory action on heat-evoked responses, though more detailed biophysical studies will be needed to elucidate the interaction of these two cations. The presence of negatively charged residues around the extracellular mouth of the channel pore appears to be a general mechanism that contributes to the potentiating effects of lanthanides in some of the TRP channels.

Conclusion

In summary, our results demonstrate that gadolinium, in addition to its well-known blocking effects on several TRP channels, activates and potentiates the vanilloid TRPV1 channel at low concentrations by direct interactions with two negatively charged residues located on the extracellular pore loop region containing the selectivity filter. Gadolinium interacts with TRPV1 at the same sites which are the targets for protonation. This finding contributes to our knowledge on TRP receptors that play critical roles in regulating the calcium entry vital to many physiological functions.

Experimental methods

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells (SD 3515; ATCC, USA) were cultured in OPTI-MEM I (Life Technologies, USA) supplemented with 5% FBS (fetal bovine serum). Cells were plated on to dishes coated with poly-L-lysine at a density ~180,000 cells cm⁻². 293 T cells were transfected transiently with 300–400 ng/dish recombinant plasmid DNA encoding wild-type or mutant rat TRPV1 in pcDNA3 vector (wild type kindly provided by D. Julius, San Francisco, CA, USA) or human TRPV3 in pcDNA5/FRT (kindly provided by A. Patapoutian, ICND, La Jolla, CA, USA) using the Lipofectamine 2000 method according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Life technologies, Scotland, UK). To identify the transfected cells in the electrophysiological experi-

ments, DNA plasmid encoding green fluorescent protein (GFP) in pQBI 25 vector (TaKaRa, Japan) was co-transfected at a concentration of 400 ng/dish. Transfected cells were replated onto glass coverslips (three 12 mm coverslips per 35 mm dish) coated with poly-L-lysine. Electrophysiological experiments were performed 24–48 h after transfection. For each experimental group, five to eight GFP positive cells per coverslip were studied from at least three different (independent) transfections.

Construction of E600A and E648A mutants of TRPV1

Rat TRPV1 mutants were constructed by PCR amplification using rat TRPV1-specific primers synthesized to contain a point mutation converting the respective nucleotides at positions E600 and E648 to A600 and A648. The QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used according to manufacturer's protocol to perform point mutations in TRPV1. The overlapping primer pairs were as follows: TRPV1-E600A, 5'-GTG GTG ACA CTG ATT **GCG** GAT GGG AAG AAT AAC-3' (sense) and 5'-GTT ATT CTT CCC ATC **CGC** AAT CAG TGT CAC CAC-3' (antisense); TRPV1-E648A, 5'-C GGC ATG GGC GAC CTG **GCG** TTC ACT GAG AAC TAC G-3' (sense) and 5'-C GTA GTT CTC AGT GAA **CGC** CAG GTC GCC CAT GCC G-3' (antisense). Base changes introducing alanine are in bold type. All site-directed mutated constructs were confirmed by DNA sequencing using an automated sequencer (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, USA).

Electrophysiology

Whole-cell membrane currents were recorded by employing an Axopatch-1D amplifier and the pCLAMP8 software (Axon Instruments, USA). Electrodes were pulled from borosilicate glass and after filling had a resistance of 4–6 M Ω . The series resistance was usually less than 10 M Ω and was compensated to ~80%. A system for fast superfusion of the cultured cells was used for drug and heat application. It consisted of a manifold of 7 fused silica capillaries connected to a common outlet made from a glass capillary around which insulated copper wire (20 μ m thick) was coiled to pass DC current for heating the solutions superfusing the cell under investigation (Dittert et al., 1998). The temperature of the superfusing solution was measured by a miniature thermocouple inserted into the outlet capillary near to its orifice that was placed less than 100 μ m from the cell under investigation. Before and after the test solutions, the cells were superfused with control extracellular solution (ECS) of the following composition (mM): NaCl, 160; KCl, 2.5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glucose, 10; pH was adjusted to 7.3 with NaOH. The intracellular pipette solution (ICS) contained (mM): Cs-gluconate, 125; CsCl, 15; EGTA, 5; HEPES, 10; NaCl, 2; CaCl₂, 0.5; ATP, 2; pH was adjusted to 7.3 with CsOH. The osmolarities of the extracellular and the intracellular solution were 320 and 290 mOsm. Capsaicin (Sigma) solution was prepared from a 0.1 M stock solution in ethanol, stored at –20°C. The final concentration of ethanol was <0.001%. Gadolinium solution was prepared from a stock solution of 100 mM GdCl₃ in distilled water.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Overall statistical significance was determined by analysis of variance, if not stated

otherwise. In case of significance ($P < 0.05$), statistical comparisons were performed by Student's *t* test for individual groups.

Acknowledgments

This work was supported by a Grant Agency of the Czech Republic, 305/03/0802, Research Project of the AS CR, AVOZ 5011922 and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, 1M0002375201 and LC 554. The authors thank Charles Edwards for a critical reading of the manuscript and Jan Teisinger for helpful discussion.

References

- Babinski, K., Catarsi, S., Biagini, G., Seguela, P., 2000. Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd³⁺. *J. Biol. Chem.* 275, 28519–28525.
- Beedle, A.M., Hamid, J., Zamponi, G.W., 2002. Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations. *J. Membr. Biol.* 187, 225–238.
- Benham, C.D., Gunthorpe, M.J., Davis, J.B., 2003. TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 33, 479–487.
- Bhave, G., Hu, H.J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W.t., 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, 12480–12485.
- Biagi, B.A., Enyeart, J.J., 1990. Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 259, C515–C520.
- Birnbaumer, L., Yildirim, E., Abramowitz, J., Yildirim, E., 2003. A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium* 33, 419–432.
- Cantor, R.S., 1999. Solute modulation of conformational equilibria in intrinsic membrane proteins: apparent “Cooperativity” without binding. *Biophys. J.* 77, 2643–2647.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.
- Cho, H., Shin, J., Shin, C.Y., Lee, S.Y., Oh, U., 2002. Mechanosensitive ion channels in cultured sensory neurons of neonatal rats. *J. Neurosci.* 22, 1238–1247.
- Chou, M.Z., Mtui, T., Gao, Y.D., Kohler, M., Middleton, R.E., 2004. Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry* 43, 2501–2511.
- Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524.
- Dittert, I., Vlachová, V., Knotková, H., Vitásková, Z., Vyklický, L., Kress, M., Reeh, P.W., 1998. A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J. Neurosci. Methods* 82, 195–201.
- Dunina-Barkovskaya, A.Y., Levina, N.N., Lew, R.R., Heath, I.B., 2004. Gadolinium effects on gigaseal formation and the adhesive properties of a fungal amoeboid cell, the slime mutant of *Neurospora crassa*. *J. Membr. Biol.* 198, 77–87.
- Elinder, F., Arhem, P., 1994. Effects of gadolinium on ion channels in the myelinated axon of *Xenopus laevis*: four sites of action. *Biophys. J.* 67, 71–83.
- Ermakov, Y.A., Averbakh, A.Z., Yusipovich, A.I., Sukharev, S., 2001. Dipole potentials indicate restructuring of the membrane interface induced by gadolinium and beryllium ions. *Biophys. J.* 80, 1851–1862.
- Ferrer-Montiel, A., Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Planells-Cases, R., 2004. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur. J. Biochem.* 271, 1820–1826.

- Gavva, N.R., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T.J., Viswanadhan, V.N., Toth, A., Pearce, L.V., Vanderah, T.W., Porreca, F., Blumberg, P.M., Lile, J., Sun, Y., Wild, K., Louis, J.C., Treanor, J.J., 2004. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J. Biol. Chem.* 279, 20283–20295.
- Gunthorpe, M.J., Smith, G.D., Davis, J.B., Randall, A.D., 2001. Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch.* 442, 668–674.
- Gunthorpe, M.J., Benham, C.D., Randall, A., Davis, J.B., 2002. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 183–191.
- Halaszovich, C.R., Zitt, C., Jungling, E., Luckhoff, A., 2000. Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 37423–37428.
- Hamill, O.P., McBride Jr., D.W., 1996. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* 48, 231–252.
- Hase, C.C., Le Dain, A.C., Martinac, B., 1995. Purification and functional reconstitution of the recombinant large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 18329–18334.
- Hille, B., 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA. 814 pp.
- Hongo, K., Pascarel, C., Cazorla, O., Gannier, F., Le Guennec, J.Y., White, E., 1997. Gadolinium blocks the delayed rectifier potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* 82, 647–656.
- Hu, H.Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C.K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L.Y., Wood, J.D., Zhu, M.X., 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J. Biol. Chem.* 279, 35741–35748.
- Jahnel, R., Dreger, M., Gillen, C., Bender, O., Kurreck, J., Hucho, F., 2001. Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur. J. Biochem.* 268, 5489–5496.
- Jordt, S.E., Julius, D., 2002. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 108, 421–430.
- Jordt, S.E., Tominaga, M., Julius, D., 2000. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8134–8139.
- Jung, S., Muhle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G., Plant, T.D., 2003. Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J. Biol. Chem.* 278, 3562–3571.
- Jung, J., Shin, J.S., Lee, S.Y., Hwang, S.W., Koo, J., Cho, H., Oh, U., 2004. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem.* 279, 7048–7054.
- Kamouchi, M., Philipp, S., Flockerzi, V., Wissenbach, U., Mamin, A., Raeymaekers, L., Eggermont, J., Droogmans, G., Nilius, B., 1999. Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Physiol.* 518 (Pt. 2), 345–358.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J., Blumberg, P.M., 2001. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* 276, 28613–28619.
- Lansman, J.B., 1990. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J. Gen. Physiol.* 95, 679–696.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., Sali, A., Hudspeth, A.J., Friedman, J.M., Heller, S., 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103, 525–535.
- Mlinar, B., Enyeart, J.J., 1993. Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J. Physiol.* 469, 639–652.
- Montell, C., Birbaumer, L., Flockerzi, V., 2002a. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108, 595–598.
- Montell, C., Birbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Bruford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A.M., Schultz, G., Shimizu, N., Zhu, M.X., 2002b. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* 9, 229–231.
- Moran, M.M., Xu, H., Clapham, D.E., 2004. TRP ion channels in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 362–369.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M., 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.* 277, 13375–13378.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., Tominaga, M., 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8002–8006.
- Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296, 2046–2049.
- Petersheim, M., Sun, J., 1989. On the coordination of La³⁺ by phosphatidylserine. *Biophys. J.* 55, 631–636.
- Prescott, E.D., Julius, D., 2003. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300, 1284–1288.
- Schaefer, M., Plant, T.D., Obukhov, A.G., Hofmann, T., Gudermann, T., Schultz, G., 2000. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J. Biol. Chem.* 275, 17517–17526.
- Schaefer, M., Plant, T.D., Stresow, N., Albrecht, N., Schultz, G., 2002. Functional differences between TRPC4 splice variants. *J. Biol. Chem.* 277, 3752–3759.
- Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K.J., Smart, D., Randall, A.D., Anand, P., Davis, J.B., 2002. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186–190.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D.E., 2001. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645–655.
- Suzuki, M., Sato, J., Kutsuwada, K., Ooki, G., Imai, M., 1999. Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *J. Biol. Chem.* 274, 6330–6335.
- Tanaka, T., Tamba, Y., Masum, S.M., Yamashita, Y., Yamazaki, M., 2002. La(3+) and Gd(3+) induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 173–182.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531–543.
- Trebak, M., Bird, G.S., McKay, R.R., Putney Jr., J.W., 2002. Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition. *J. Biol. Chem.* 277, 21617–21623.
- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S., Oteiza, P.I., 1997. Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 121–127.
- Vyklický, L., Vlachová, V., Vitásková, Z., Dittert, I., Kabát, M., Orkand, R.K., 1999. Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J. Physiol. (London)* 517, 181–192.
- Welch, J.M., Simon, S.A., Reinhart, P.H., 2000. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13889–13894.
- Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P.S., Curtis, R., Clapham, D.E., 2002. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181–186.
- Yang, X.C., Sachs, F., 1989. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 243, 1068–1071.
- Zhu, X., Jiang, M., Birbaumer, L., 1998. Receptor-activated Ca²⁺ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca²⁺ entry. *J. Biol. Chem.* 273, 133–142.

6. ZÁVĚR

- Vyslovili jsme hypotézu, že akutní desenzitizace TRPV1 receptoru může být funkčním odrazem jeho snížené afinity k ligandu. Prokázali jsme, že desenzitizovaný TRPV1 kanál ve srovnání s nedesenzitizovaným vykazuje v heterologním expresním systému daleko pomalejší rychlost aktivace a naopak rychlejší časovou konstantu deaktivace. Zjistili jsme, že aktivita desenzitizovaného TRPV1 receptoru může být navrácena ke své původní maximální hodnotě aplikací vysokých koncentrací agonistů (kapsaicinu i piperinu), čímž se tento iontový kanál zásadně odlišuje od jiných chemicky aktivovaných kanálů.
- Prokázali jsme, že defosforylace serinu 502 a threoninu 704 není příčinou akutní desenzitizace, jak se dosud předpokládalo, ale že pro správnou funkci TRPV1 kanálu je s velkou pravděpodobností nutná funkční interakce těchto dvou aminokyselinových zbytků. Naše výsledky podporují hypotézu, že vápenaté ionty procházející pórem aktivovaného iontového kanálu vyvolávají rozsáhlé konformační změny TRPV1 proteinu zahrnující oblast vazebného místa pro kapsaicin i oblast proximálního karboxylového konce. Interakce těchto dvou oblastí je zřejmě významně ovlivňována membránovým fosfolipidem PIP₂.
- Charakterizovali jsme mechanismy, kterými oxidační a redukční látky senzitivují membránové proudy zprostředkované rekombinantním TRPV1 receptorem vyvolané bolestivým teplem ($\geq 43^\circ\text{C}$). Prokázali jsme, že redukční látky s největší pravděpodobností působí přímo na TRPV1 kanál. Oxidační látky mohou snižovat koncentraci aktivátorů TRPV1 kanálu. Extracelulární cystein 621 zaujímá klíčové místo v DTT potenciaci odpovědi na teplo. Na základě pokusů s cysteinovými mutanty TRPV1 receptoru (C616G, C621G, C634G a 3CYS) jsme prokázali, že potenciační účinek oxidačních látek není zprostředkován extracelulárními cysteiny.
- Zjistili jsme, že oxidační činidlo komplex mědi s 1.10-fenantrolinem blokuje TRPV1 kanál koncentračně a napěťově závislým způsobem. Blokující účinek není zprostředkován extracelulárními cysteiny (C616, C621 a C634) lokalizovanými v póru iontového kanálu a nejde tedy o oxidaci.

- Objasnili jsme mechanismy působení gadolinia na TRPV1 receptor. Zjistili jsme, že gadolinium jako blokátor mnoha typů iontových kanálů působí třemi různými účinky na vaniloidní TRPV1 receptor: aktivačním, senzitivizačním (modulačním) a inhibičním. Gadolinium aktivuje TRPV1 kanál při pokojové teplotě koncentračně závislým způsobem a jeho aktivační a senzitivizační účinek na membránové proudy vyvolané teplem i kapsaicinem je zprostředkován podobným mechanismem jako jsou účinky protonů, tj. interakcí s negativně nabitými glutamáty E600 a E648 umístěnými v blízkosti póru iontového kanálu. Gadolinium při vyšších koncentracích ($> 100 \mu\text{M}$) navíc přímo blokuje TRPV1 kanál tím, že prochází jeho pórem jako nosič náboje.

Přínos dizertační práce v oblasti výzkumu bolesti

Výsledky, které jsou součástí této dizertační práce přispívají k bližšímu poznání biofyzikální a molekulární podstaty aktivace vaniloidního receptoru ve vztahu k jeho možné fyziologické úloze na polymodálních nociceptorech a objasňují některé mechanismy, které se mohou podílet na vzniku některých chronických bolestivých stavů.

Některé dílčí výsledky, které se týkají molekulárních mechanismů akutní desenzitizace závislé na vápníku, by mohly v budoucnu přispět k vysvětlení nežádoucích účinků provázejících klinické využití vaniloidních látek při léčbě neuropatických stavů, případně být podkladem pro vývoj nových léčebných postupů. Je známo, že aktivita TRPV1 receptoru je významně modulována přítomností mediátorů zánětu. Nové poznatky této dizertační práce prokazují, že pro aktivitu receptoru je důležité také optimální oxidačně-redukční prostředí a je-li porušeno (směrem k více oxidovanému nebo více redukovanému stavu) TRPV1 receptor je senzitivizován. Tento mechanismus modulace se může uplatňovat například při některých patologických stavech spojených s neuropatickým onemocněním. Studie zaměřené na poznání molekulárních mechanismů účinků gadolinia a oxidační látky komplexu mědi s fenantrolinem přispívají k upřesnění struktury vnější oblasti póru TRPV1 iontového kanálu a tím i k bližší specifikaci účinné chemické struktury látek s potenciálním blokujícím účinkem, které by mohly být předlohou pro vývoj nových přesně cílených analgetik.

Postupné a cílené rozšiřování dosavadních resp. získání nových znalostí o struktuře a funkci TRPV1 receptoru mohou vést k odhalení dosud neprozkoumaných vztahů mezi TRPV1 receptorem, resp. dalšími receptory z TRP skupiny, a různými patologickými stavy, a přispět tak ke zkvalitňování již existujících a objevování nových léků či léčebných postupů tisících bolest u lidí.

7. SEZNAM ČLÁNKŮ PUBLIKOVANÝCH V RÁMCI PHD STUDIA

7.1 Impaktované články

Publikace v časopisech s IF

1. **Novakova - Tousova K.**, Ladislav Vyklicky sn., Klara Susankova, Jan Benedikt, Abdul Samad, Jan Teisinger, Viktorie Vlachova: Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel (TRPV1) during and after acute desensitization.

Neuroscience 2007, 149: 144-154 (IF 3.427)

2. Susankova K., **Tousova K.**, Vyklicky L. sn., Teisinger J., Vlachova V.: Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current.

Molecular Pharmacology 2006, 70: 383-394 (IF 4.612)

3. **Tousova K.**, Susankova K., Teisinger J., Vyklicky L. sn., Vlachova V.: Oxidizing reagent copper-o-phenanthroline is an open channel blocker of the vanilloid receptor TRPV1.

Neuropharmacology 2004 Aug; 47(2): 273-285 (IF 3.801)

4. **Tousova K.**, Vyklicky L. sn., Susankova K., Vlachova V.: Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites.

Molecular and Cellular Neuroscience 2005 July, 30: 207-217 (IF 4.231)

5. Krusek J., Dittert I., Hendrych T., Hnik P., Horak M., Petrovic M., Sedlacek M., Susankova K., Svobodova L., **Tousova K.**, Ujec E., Vlachova V., Vyklicky L. sn., Vyskocil F., Vyklicky L. jr.: Activation and modulation of ligand-gated ion channels.

Physiological Research 2004; 53 Supplement 1: S103-113 (IF 0.939)

6. Vyklický L., **Novakova-Tousova K.**, Benedikt J., Samad A., Tousek F., Vlachová V.: Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin.
Physiological Research 2008; 57 Supplement 3: S59-68 (IF 1.505)

Publikace v časopisech bez IF

Karolina Toušová, Jan Benedikt, Abdul Samad, Ladislav Vyklický, Viktorie Vlachová: Analgetické účinky kapsaicinu – 10 let hledání molekulárních mechanismů.
Psychiatrie (časopis pro moderní psychiatrii) 2007; Volume 11; Supplementum 3, 12-13
(*abstrakt*)

Karolina Toušová, Jan Benedikt, Abdul Samad, Ladislav Vyklický, a Viktorie Vlachová: Analgetické účinky kapsaicinu: tisíce let nepoznaný mechanismus.
Bolest 2007, Issue 2, 19-24

Jan Benedikt, Ladislav Vyklický, **Karolina Toušová** a Viktorie Vlachová: TRP iontové kanály: Molekulární senzory v nervové soustavě.
Psychiatrie (časopis pro moderní psychiatrii) 2005; Volume 9; Supplementum 3, 6-11.

Vyklický L. ml., Horák M., Petrovič M., Sedláček M., Sušánková K., **Toušová K.**, Vyklický L. st., Vlachová V.: Iontové kanály a modulace jejich aktivity fyzikálními a chemickými podněty.
Psychiatrie (časopis pro moderní psychiatrii) 2004; Volume 8; Supplementum 3, 6-12.

Vyklický L., Sušánková K., **Toušová K.**, Vlachová V.: Vaniloidní receptor TRPV1: aktivace, modulace a úloha v mechanismech nocicepce.
Pohybové ústrojí (Pokroky ve výzkumu, diagnostice a terapii) 2004, ročník 11, č. 1+2

8. LITERATURA

- Abolish, Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt EK, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelands TR, Moreland RB, Decker MW, Lee CH, Sullivan JP, Faltynek CR (2006) TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* 26:9385-9393.
- Acs G, Palkovits M, Blumberg PM (1996) Specific binding of [³H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sci* 59:1899-1908.
- Ahern GP, Premkumar LS (2002) Voltage-dependent priming of rat vanilloid receptor: effects of agonist and protein kinase C activation. *J Physiol* 545:441-451.
- Ahern GP, Wang X, Miyares RL (2006) Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem* 281:8991-8995.
- Benedikt J, Teisinger J, Vyklicky L, Vlachova V (2007) Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulating its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurochem* 100:211-224.
- Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC (1992) Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107:544-552.
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35:721-731.
- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt (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* 100:12480-12485.
- Brauchi S, Orto P, Latorre R (2004) Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15494-15499.
- Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, Rosenmann E, Gonzalez-Nilo F, Latorre R (2007) Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10246-10251.
- Caterina MJ (2007) Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R64-76.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.
- Cesare P, McNaughton P (1996) A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15435-15439.
- Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396.

- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D (2003) International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 55:591-596.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57:427-450.
- Colbert HA, Smith TL, Bargmann CI (1997) OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17:8259-8269.
- Correll CC, Phelps PT, Anthes JC, Umland S, Greenfeder S (2004) Cloning and pharmacological characterization of mouse TRPV1. *Neurosci Lett* 370:55-60.
- Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, Di Marzo V (2008) Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* 151:955-968.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187.
- De Petrocellis L, Di Marzo V (2005) Lipids as regulators of the activity of transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels. *Life Sci* 77:1651-1666.
- De Petrocellis L, Chu CJ, Moriello AS, Kellner JC, Walker JM, Di Marzo V (2004) Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *Br J Pharmacol* 143:251-256.
- Delmas P (2005) Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors. *Pflugers Arch* 451:264-276.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Dilger JP (2002) The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br J Anaesth* 89:41-51.
- Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V (2006) Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* 151:178-185.
- Dittert I, Vlachová V, Knotková H, Vitásková Z, Vyklický L, Kress M, Reeh PW (1998) A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods* 82:195-201.
- Doherty EM, Fotsch C, Bo Y, Chakrabarti PP, Chen N, Gavva N, Han N, Kelly MG, Kincaid J, Klionsky L, Liu Q, Ognyanov VI, Tamir R, Wang X, Zhu J, Norman MH, Treanor JJ (2005) Discovery of potent, orally available vanilloid receptor-1 antagonists. Structure-activity relationship of N-aryl cinnamides. *J Med Chem* 48:71-90.
- Doherty EM, Fotsch C, Bannon AW, Bo Y, Chen N, Dominguez C, Falsey J, Gavva NR, Katon J, Nixey T, Ognyanov VI, Pettus L, Rzasa RM, Stec M, Surapaneni S, Tamir R, Zhu J, Treanor JJ, Norman MH (2007) Novel Vanilloid Receptor-1 Antagonists: 2. Structure-Activity Relationships of 4-Oxopyrimidines Leading to the Selection of a Clinical Candidate. *J Med Chem*.

- Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS (1997) Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 121:1461-1467.
- Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW (1996) Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflügers Arch* 431:828-837.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Dray A, Forbes CA, Burgess GM (1990) Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett* 110:52-59.
- El Kouhen R, Surowy CS, Bianchi BR, Neelands TR, McDonald HA, Niforatos W, Gomtsyan A, Lee CH, Honore P, Sullivan JP, Jarvis MF, Faltynek CR (2005) A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel and selective transient receptor potential type V1 receptor antagonist, blocks channel activation by vanilloids, heat, and acid. *J Pharmacol Exp Ther* 314:400-409.
- Ferrer-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Planells-Cases R (2004) Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 271:1820-1826.
- Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A (2000) Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem* 275:32552-32558.
- Garcia-Martinez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Perez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A (2002) Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2374-2379.
- Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon AW, Louis JC, Treanor JJ (2005) AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 313:474-484.
- Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, Treanor JJ (2004) Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 279:20283-20295.
- Gavva NR, Bannon AW, Surapaneni S, Hovland DN, Jr., Lehto SG, Gore A, Juan T, Deng H, Han B, Klionsky L, Kuang R, Le A, Tamir R, Wang J, Youngblood B, Zhu D, Norman MH, Magal E, Treanor JJ, Louis JC (2007) The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* 27:3366-3374.
- Gibson HE, Edwards JG, Page RS, Van Hook MJ, Kauer JA (2008) TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57:746-759.

- Gilbert D, Funk K, Dekowski B, Lechler R, Keller S, Mohrlen F, Frings S, Hagen V (2007) Caged capsaicins: New tools for the examination of TRPV1 channels in somatosensory neurons. *Chembiochem* 8:89-97.
- Gordon SE, Varnum MD, Zagotta WN (1997) Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 19:431-441.
- Gunthorpe MJ, Harries MH, Prinjha RK, Davis JB, Randall A (2000) Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol* 525 Pt 3:747-759.
- Gunthorpe MJ, Hannan SL, Smart D, Jerman JC, Arpino S, Smith GD, Brough S, Wright J, Egerton J, Lappin SC, Holland VA, Winborn K, Thompson M, Rami HK, Randall A, Davis JB (2007) Characterization of SB-705498, a potent and selective vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) antagonist that inhibits the capsaicin-, acid-, and heat-mediated activation of the receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1183-1192.
- Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, Luis Hannan S, Lappin SC, Egerton J, Smith GD, Worby A, Howett L, Owen D, Nasir S, Davies CH, Thompson M, Wyman PA, Randall AD, Davis JB (2004) Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology* 46:133-149.
- Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG (2000) Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408:990-994.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Glozier IS, Davis JB (2000) Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88:205-215.
- Hellwig N, Plant TD, Janson W, Schafer M, Schultz G, Schaefer M (2004) TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem* 279:34553-34561.
- Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, Gomtsyan A, El Kouhen R, Lee CH, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF (2005) A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 314:410-421.
- Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279:35741-35748.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8400-8405.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6155-6160.

- Cheng W, Yang F, Takanishi CL, Zheng J (2007) Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *J Gen Physiol* 129:191-207.
- Chou MZ, Mtui T, Gao YD, Kohler M, Middleton RE (2004) Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry* 43:2501-2511.
- Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM (2003) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 278:13633-13639.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411:957-962.
- Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J, Hucho F (2001) Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur J Biochem* 268:5489-5496.
- Jin X, Touhey J, Gaudet R (2006) Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J Biol Chem* 281:25006-25010.
- Jin X, Morsy N, Winston J, Pasricha PJ, Garrett K, Akbarali HI (2004) Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C558-563.
- Jordt SE, Julius D (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108:421-430.
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8134-8139.
- Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U (2004) Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 279:7048-7054.
- Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U (2002) Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 277:44448-44454.
- Kardos J, Nyikos L (2001) Universality of receptor channel responses. *Trends Pharmacol Sci* 22:642-645.
- Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276:28613-28619.
- Kitaguchi T, Swartz KJ (2005) An inhibitor of TRPV1 channels isolated from funnel Web spider venom. *Biochemistry* 44:15544-15549.
- Kobashi K (1968) Catalytic oxidation of sulfhydryl groups by o-phenanthroline copper complex. *Biochim Biophys Acta* 158:239-245.
- Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS (1997) The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17:3525-3537.
- Kosower NS, Kosower EM, Wertheim B, Correa WS (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun* 37:593-596.
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G (2007) ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium*.

- Lee G, Abdi K, Jiang Y, Michaely P, Bennett V, Marszalek PE (2006) Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature* 440:246-249.
- Lee J, Kim SY, Lee J, Kang M, Kil MJ, Choi HK, Jin MK, Wang Y, Toth A, Pearce LV, Lundberg DJ, Tran R, Blumberg PM (2004) Analysis of structure-activity relationships with the N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea template for vanilloid receptor 1 antagonism. *Bioorg Med Chem* 12:3411-3420.
- Lee J, Lee J, Kang M, Shin M, Kim JM, Kang SU, Lim JO, Choi HK, Suh YG, Park HG, Oh U, Kim HD, Park YH, Ha HJ, Kim YH, Toth A, Wang Y, Tran R, Pearce LV, Lundberg DJ, Blumberg PM (2003) N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues: novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor. *J Med Chem* 46:3116-3126.
- Liapi A, Wood JN (2005) Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 22:825-834.
- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54:905-918.
- Liu B, Zhang C, Qin F (2005) Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25:4835-4843.
- Liu L, Simon SA (1997) Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neurosci Lett* 228:29-32.
- Liu L, Simon SA (1998) The influence of removing extracellular Ca²⁺ in the desensitization responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res* 809:246-252.
- Lu G, Henderson D, Liu L, Reinhart PH, Simon SA (2005) TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant. *Mol Pharmacol* 67:1119-1127.
- Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T (2007) Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci* 27:7070-7080.
- Lyfenko A, Vlachova V, Vyklicky L, Dittert I, Kress M, Reeh PW (2002) The effects of mild heat injury on membrane currents induced by noxious heat in cultured DRG neurones from neonatal rats. *Pain* 95:207-214.
- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A (2005) The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* 15:929-934.
- Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogalis BD, Tominaga M (2006) Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123:106-116.
- Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7:179-185.
- Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kossel M, Holsboer F, Zieglgansberger W, Landgraf R, Lutz B, Wotjak CT (2007) Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 27:832-839.

- Marszalek JR, Lodish HF (2005) Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:633-657.
- Matta JA, Ahern GP (2007) Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* 585:469-482.
- Matta JA, Miyares RL, Ahern GP (2007) TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* 578:397-411.
- McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58.
- McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ (2005) Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol* 144:781-790.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3655-3660.
- Mohapatra DP, Wang SY, Wang GK, Nau C (2003) A tyrosine residue in TM6 of the Vanilloid Receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. *Mol Cell Neurosci* 23:314-324.
- Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005:re3.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9:229-231.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J (2005) Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25:4052-4061.
- Nilius B (2007) TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta*.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165-217.
- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2005) Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567:35-44.
- Norman MH, Zhu J, Fotsch C, Bo Y, Chen N, Chakrabarti P, Doherty EM, Gavva NR, Nishimura N, Nixey T, Ognyanov VI, Rzasa RM, Stec M, Surapaneni S, Tamir R, Viswanadhan VN, Treanor JJ (2007) Novel Vanilloid Receptor-1 Antagonists: 1. Conformationally Restricted Analogues of trans-Cinnamides. *J Med Chem*.
- Novakova-Tousova K, Vyklicky L, Susankova K, Benedikt J, Samad A, Teisinger J, Vlachova V (2007) Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience* 149:144-154.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277:13375-13378.
- Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M (2003) Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8002-8006.
- Ognyanov VI, Balan C, Bannon AW, Bo Y, Dominguez C, Fotsch C, Gore VK, Kliensky L, Ma VV, Qian YX, Tamir R, Wang X, Xi N, Xu S, Zhu D, Gavva NR, Treanor JJ, Norman MH (2006) Design of potent, orally available

- antagonists of the transient receptor potential vanilloid 1. Structure-activity relationships of 2-piperazin-1-yl-1H-benzimidazoles. *J Med Chem* 49:3719-3742.
- Oh U, Hwang SW, Kim D (1996) Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 16:1659-1667.
- Olah Z, Karai L, Iadarola MJ (2002) Protein kinase C(alpha) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 277:35752-35759.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2005) Permeation and Selectivity of TRP Channels. *Annu Rev Physiol*.
- Owsianik G, D'Hoedt D, Voets T, Nilius B (2006) Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156:61-90.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296:2046-2049.
- Petersen MT, Jonson PH, Petersen SB (1999) Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins. *Protein Eng* 12:535-548.
- Phelps PT, Anthes JC, Correll CC (2005) Cloning and functional characterization of dog transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1). *Eur J Pharmacol* 513:57-66.
- Pingle SC, Matta JA, Ahern GP (2007) Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol*:155-171.
- Piper AS, Yeats JC, Bevan S, Docherty RJ (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):721-733.
- Planells-Cases R, Aracil A, Merino JM, Gallar J, Perez-Paya E, Belmonte C, Gonzalez-Ros JM, Ferrer-Montiel AV (2000) Arginine-rich peptides are blockers of VR-1 channels with analgesic activity. *FEBS Lett* 481:131-136.
- Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K (2003) N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. in vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 306:387-393.
- Popa MO, Lerche H (2006) Cu²⁺ (1,10 phenanthroline)₃ is an open-channel blocker of the human skeletal muscle sodium channel. *Br J Pharmacol* 147:808-814.
- Premkumar LS, Ahern GP (2000) Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408:985-990.
- Premkumar LS, Qi ZH, Van Buren J, Raisinghani M (2004) Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J Neurophysiol* 91:1442-1449.
- Prescott ED, Julius D (2003) A modular PIP₂ binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300:1284-1288.
- Puntambekar P, Van Buren J, Raisinghani M, Premkumar LS, Ramkumar V (2004) Direct interaction of adenosine with the TRPV1 channel protein. *J Neurosci* 24:3663-3671.
- Qin F (2007) Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Handb Exp Pharmacol*:509-525.

- Rami HK, Thompson M, Wyman P, Jerman JC, Egerton J, Brough S, Stevens AJ, Randall AD, Smart D, Gunthorpe MJ, Davis JB (2004) Discovery of small molecule antagonists of TRPV1. *Bioorg Med Chem Lett* 14:3631-3634.
- Rami HK, Thompson M, Stemp G, Fell S, Jerman JC, Stevens AJ, Smart D, Sargent B, Sanderson D, Randall AD, Gunthorpe MJ, Davis JB (2006) Discovery of SB-705498: a potent, selective and orally bioavailable TRPV1 antagonist suitable for clinical development. *Bioorg Med Chem Lett* 16:3287-3291.
- Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M (2002) PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 22:4740-4745.
- Rigoni M, Trevisani M, Gazzieri D, Nadaletto R, Tognetto M, Creminon C, Davis JB, Campi B, Amadesi S, Geppetti P, Harrison S (2003) Neurogenic responses mediated by vanilloid receptor-1 (TRPV1) are blocked by the high affinity antagonist, iodo-resiniferatoxin. *Br J Pharmacol* 138:977-985.
- Roberts JC, Davis JB, Benham CD (2004) [³H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res* 995:176-183.
- Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE (2005) PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8:626-634.
- Rosenbaum T, Gordon SE (2002) Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron* 33:703-713.
- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE (2004) Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123:53-62.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE (2002) The TRPM7 channel is inactivated by PIP₂ hydrolysis. *Nat Cell Biol* 4:329-336.
- Rutter AR, Ma QP, Leveridge M, Bonnert TP (2005) Heteromerization and colocalization of TrpV1 and TrpV2 in mammalian cell lines and rat dorsal root ganglia. *Neuroreport* 16:1735-1739.
- Saito S, Shingai R (2006) Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates. *Physiol Genomics* 27:219-230.
- Salazar H, Llorente I, Jara-Oseguera A, Garcia-Villegas R, Munari M, Gordon SE, Islas LD, Rosenbaum T (2008) A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat Neurosci* 11:255-261.
- Salem N, Jr., Litman B, Kim HY, Gawrisch K (2001) Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36:945-959.
- Sands Z, Grottesi A, Sansom MS (2005) Voltage-gated ion channels. *Curr Biol* 15:R44-47.
- Savidge J, Davis C, Shah K, Colley S, Phillips E, Ranasinghe S, Winter J, Kotsonis P, Rang H, McIntyre P (2002) Cloning and functional characterization of the guinea pig vanilloid receptor 1. *Neuropharmacology* 43:450-456.
- Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, Kobayashi S (2007) Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res* 1160:39-46.
- Shimizu I, Iida T, Horiuchi N, Caterina MJ (2005) 5-Iodoresiniferatoxin evokes hypothermia in mice and is a partial transient receptor potential vanilloid 1 agonist in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1378-1385.
- Schlieff T, Schonherr R, Heinemann SH (1996) Modification of C-type inactivating Shaker potassium channels by chloramine-T. *Pflugers Arch* 431:483-493.

- Schulte U, Hahn H, Wiesinger H, Ruppertsberg JP, Fakler B (1998) pH-dependent gating of ROMK (Kir1.1) channels involves conformational changes in both N and C termini. *J Biol Chem* 273:34575-34579.
- Schumacher MA, Moff I, Sudanagunta SP, Levine JD (2000a) Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes. *J Biol Chem* 275:2756-2762.
- Schumacher MA, Jong BE, Frey SL, Sudanagunta SP, Capra NF, Levine JD (2000b) The stretch-inactivated channel, a vanilloid receptor variant, is expressed in small-diameter sensory neurons in the rat. *Neurosci Lett* 287:215-218.
- Siemens J, Zhou S, Piskorowski R, Nikai T, Lumpkin EA, Basbaum AI, King D, Julius D (2006) Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444:208-212.
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186-190.
- Spicarova D, Palecek J (2008) The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation. *Physiol Res*.
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114:13-33.
- Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE (2006) Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* 128:509-522.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-829.
- Susankova K, Ettrich R, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V (2007) Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J Neurosci* 27:7578-7585.
- Suzuki M, Sato J, Kutsuwada K, Ooki G, Imai M (1999) Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *J Biol Chem* 274:6330-6335.
- Szallasi A (2005) Piperine: researchers discover new flavor in an ancient spice. *Trends Pharmacol Sci* 26:437-439.
- Szallasi A, Blumberg PM (1993) [³H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:84-91.
- Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51:159-212.
- Szallasi A, Lewin NA, Blumberg PM (1993) Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 266:678-683.
- Szallasi A, Blumberg PM, Annicelli LL, Krause JE, Cortright DN (1999) The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pharmacol* 56:581-587.
- Szolcsanyi J, Sandor Z, Petho G, Varga A, Boleskei K, Almasi R, Riedl Z, Hajos G, Czeh G (2004) Direct evidence for activation and desensitization of the

- capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell, line in gene deleted mice and in the rat. *Neurosci Lett* 361:155-158.
- Tian W, Fu Y, Wang DH, Cohen DM (2006) Regulation of TRPV1 by a novel renally expressed rat TRPV1 splice variant. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F117-126.
- Tominaga M, Tominaga T (2005) Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 451:143-150.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.
- Toth A, Blumberg PM, Chen Z, Kozikowski AP (2004) Design of a high-affinity competitive antagonist of the vanilloid receptor selective for the calcium entry-linked receptor population. *Mol Pharmacol* 65:282-291.
- Toth A, Kedei N, Szabo T, Wang Y, Blumberg PM (2002) Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 293:777-782.
- Tousova K, Susankova K, Teisinger J, Vyklicky L, Vlachova V (2004) Oxidizing reagent copper-o-phenanthroline is an open channel blocker of the vanilloid receptor TRPV1. *Neuropharmacology* 47:273-285.
- Tousova K, Vyklicky L, Susankova K, Benedikt J, Vlachova V (2005) Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci* 30:207-217.
- Toušová K, Benedikt J, Samad A, Vyklický L, Vlachová V (2007) Analgetické účinky kapsaicinu: tisíce let nepoznaný mechanismus. *Bolest*:19-24.
- Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC, Brough SJ, Owen D, Smith GD, Randall AD, Harrison S, Bianchi A, Davis JB, Geppetti P (2002) Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* 5:546-551.
- Vlachova V, Lyfenko A, Orkand RK, Vyklicky L (2001) The effects of capsaicin and acidity on currents generated by noxious heat in cultured neonatal rat DRG neurones. *Journal of Physiology* 533.3:717-728.
- Vlachova V, Lyfenko A, Vyklicky L, Orkand RK (2002a) Suramin affects capsaicin responses and capsaicin-noxious heat interactions in rat dorsal root ganglia neurones. *Physiol Res* 51:193-198.
- Vlachova V, Susankova K, Lyfenko A, Kuffler DP, Vyklicky L (2002b) Kapsaicinový receptor - specifický iontový kanál pro detekci bolestivých podnětů. *Psychiatrie (časopis pro moderní psychiatrii)* 6:6-13.
- Vlachova V, Teisinger J, Sušánková K, Lyfenko A, Etrich R, Vyklicky L (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 23:1340-1350.
- Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B (2004a) Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *J Biol Chem* 279:15223-15230.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004b) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430:748-754.
- Vos MH, Neelands TR, McDonald HA, Choi W, Kroeger PE, Puttfarcken PS, Faltynek CR, Moreland RB, Han P (2006) TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J Neurochem* 99:1088-1102.

- Vyklicky L, Lyfenko A, Kuffler DP, Vlachova VV (2003) Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport* 14:1061-1065.
- Vyklicky L, Lyfenko A, Susankova K, Teisinger J, Vlachova V (2002) Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience* 111:435-441.
- Vyklicky L, Knotkova-Urbancova H, Vitaskova Z, Vlachova V, Kress M, Reeh PW (1998) Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J Neurophysiol* 79:670-676.
- Vyklicky L, Vlachova V, Vitásková Z, Dittert I, Kabát M, Orkand RK (1999) Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J Physiol (Lond)* 517:181-192.
- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C (2001) Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 59:9-15.
- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P (2003) The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304:56-62.
- Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Masdin KJ, Perkins MN, Winter J (1993a) Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *J Med Chem* 36:2373-2380.
- Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Perkins MN, Reid DJ, Winter J (1993b) Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A-region". *J Med Chem* 36:2362-2372.
- Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Masdin KJ, Perkins MN, Winter J (1993c) Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region". *J Med Chem* 36:2381-2389.
- Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX (2004a) An alternative splicing product of the murine *trpv1* gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem* 279:37423-37430.
- Wang HL, Katon J, Balan C, Bannon AW, Bernard C, Doherty EM, Dominguez C, Gavva NR, Gore V, Ma V, Nishimura N, Surapaneni S, Tang P, Tamir R, Thiel O, Treanor JJ, Norman MH (2007) Novel Vanilloid Receptor-1 Antagonists: 3. The Identification of a Second-Generation Clinical Candidate with Improved Physicochemical and Pharmacokinetic Properties. *J Med Chem*.
- Wang Y, Keddi N, Wang M, Wang QJ, Huppler AR, Toth A, Tran R, Blumberg PM (2004b) Interaction between protein kinase C α and the vanilloid receptor type 1. *J Biol Chem* 279:53674-53682.
- Wang Y, Szabo T, Welter JD, Toth A, Tran R, Lee J, Kang SU, Suh YG, Blumberg PM (2002) High affinity antagonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* 62:947-956.
- Wang Y, Toth A, Tran R, Szabo T, Welter JD, Blumberg PM, Lee J, Kang SU, Lim JO, Lee J (2003) High-affinity partial agonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* 64:325-333.
- Welch JM, Simon SA, Reinhart PH (2000) The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13889-13894.

- Xi N, Bo Y, Doherty EM, Fotsch C, Gavva NR, Han N, Hungate RW, Klionsky L, Liu Q, Tamir R, Xu S, Treanor JJ, Norman MH (2005) Synthesis and evaluation of thiazole carboxamides as vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 15:5211-5217.
- Xu H, Blair NT, Clapham DE (2005) Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* 25:8924-8937.
- Yamaguchi H, Matsushita M, Nairn AC, Kuriyan J (2001) Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol Cell* 7:1047-1057.
- Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE (1999) Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol* 1:183-188.
- Zhang M, Wang H, Tracey KJ (2000) Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit Care Med* 28:N60-66.
- Zhang X, Huang J, McNaughton PA (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *Embo J* 24:4211-4223.
- Zhu S, Darbon H, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J (2003) Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *Faseb J* 17:1765-1767.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457.

9. SEZNAM ZKRATEK

AC	adenylylcykláza
AChR	nikotinický acetylcholinový receptor
2-APB	2-aminoetoxydifenyl borát
ASIC	acid-sensing ion channel, iontový kanál aktivovaný kyselým prostředím
ATP	adenozintrifosfát
CaM	kalmodulin
CaMKII	kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Ch-T	chloramin-T
DAG	diacylglycerol
DRG	dorsal root ganglion, ganglion zadních kořenů míšních, spinální ganglion
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DTT	dithiothreitol
ER	endoplazmatické retikulum
FSK	forskolin
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GPCR	G-protein coupled receptor, receptor spřažený s G-proteiny
GSH	redukováná forma glutathionu, gama-glutamylcysteinylglycin
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
IP ₃	inozitol-1,4,5-trisfosfát
kDa	kilodalton
NADA	N-arachidonyl dopamin
NEM	N-ethylmaleimid
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NompC	no mechanoreceptor potential C, mechanosenzorický iontový kanál u <i>Drosophily melanogaster</i>

OLDA	N-oleoyldopamin
P2XR	purinergní receptor
PKA	proteinkináza A
PIP ₂	fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát
PKC	proteinkináza C
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
RTX	reziniferatoxin
S1-S6	1. až 6. transmembránová doména
SIC	strech-inhibitable channel, iontový kanál aktivovaný zvýšeným osmotickým tlakem
TRPV1	transient receptor potential vanilloid receptor-1, vanilodní (kapsaicinový) receptor