

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Alexandra Ptáková

Buněčné a molekulární mechanismy regulace TRPC5 receptoru
Cellular and molecular mechanisms of TRPC5 regulation

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Konzultant: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc. se podílela na návrzích experimentů a analýze dat. Část týkající se molekulárního modelování byla vypracována ve spolupráci s RNDr. Ivanem Barvíkem, Ph.D. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha 2. 8. 2022

.....

Alexandra Ptáková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc. za odborné vedení během provádění experimentů a při sepisování diplomové práce, za její trpělivost, laskavý přístup a pracovní nasazení, kterými mě inspiruje. Děkuji RNDr. Ivanovi Barvíkovi, Ph.D. za uvedení do základů molekulárního modelování, za podnětné diskuze a jeho vynalézavost. Ráda bych poděkovala také kolegům z oddělení Buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR, zejména Mgr. Lucii Zímové, Ph.D. za pomocnou ruku a sdílení zkušeností, Ing. Ivanovi Dittertovi, CSc. za jeho technické dovednosti, RNDr. Janovi Krůškovi, CSc. za cenné rady, Bc. Michalovi Mitrovi za zdatnost v oblastech molekulární biologie a Mgr. Romaně Markové za přípravu buněčných kultur. V neposlední řadě děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy za finanční podporu projektu formou grantu č. 297921 a Zuzaně Soukupové za ochotu a veškerou pomoc.

Abstrakt

Iontový kanál TRPC5 je molekulární detektor chladu podílející na vzniku neuropatické a zánětlivé bolesti v periferním nervovém systému. Jeho možné zapojení v mechanismech rozvoje chladové alodynie objevující se jako vedlejší účinek chemoterapeutické léčby není dosud prozkoumáno. Elektrofyzilogickou metodou terčíkového zámku a mikroskopickou metodou zobrazování změn intracelulárních koncentrací vápenatých iontů byly prozkoumány aktivační vlastnosti lidského TRPC5 receptoru exprimovaného v HEK293T buňkách v souvislosti s působením nízkých teplot a oxaliplatin – hojně využívaného cytostatika s vedlejšími účinky, které se často projevují jako periferní neuropatie doprovázená bolestí provokovanou chladovými podněty. S využitím metod molekulárního modelování byly navrženy mechanismy možného působení oxaliplatin a lysofosfatidylcholinu 18:1, jehož hladina se působením oxaliplatin zvyšuje. Chlad (5 °C) snížil amplitudu membránových proudů vyvolaných agonistou a zpomalil jejich deaktivaci. Snímání aktivity jednotlivých kanálů odhalilo, že snížení teploty vede ke zvýšení pravděpodobnosti otevření, prodloužení doby otevření a zkrácení doby zavření. Nejvyšší chladovou citlivost vykazuje TRPC5 přibližně mezi 16–11 °C, kdy se kanál otevírá a zavírá s hodnotou teplotního koeficientu $Q_{10} \sim 0,04$. Chladová aktivace kanálu je ovlivněna interakcí s proteinem STIM1 a závisí na regulaci signální dráhou spřaženou s $G_{q/11}$ proteiny. Akutní aplikace oxaliplatin má inhibiční vliv na TRPC5, zatímco 24h inkubace v oxaliplatině zvyšuje aktivitu kanálů. TRPC5 by mohl být jedním z iontových kanálů zapojených do vzniku chladové přecitlivělosti vyvolané oxaliplatinou.

Klíčová slova: TRPC5, chlad, chladová aktivace, PKC, STIM1, oxaliplatin, oxaliplatinou vyvolaná periferní neuropatie

Abstract

The TRPC5 ion channel is a molecular cold detector involved in the development of neuropathic and inflammatory pain in the peripheral nervous system. Its possible involvement in the mechanisms of the development of cold allodynia emerging as a side effect of chemotherapeutic treatment has not yet been investigated. The activation properties of the human TRPC5 receptor expressed in HEK293T cells in the context of exposure to low temperatures and oxaliplatin – widely used cytostatic drug, which side effects often manifest as a peripheral neuropathy triggered or enhanced by cold temperatures, were investigated using patch clamp electrophysiology and calcium imaging. Molecular modelling was used to explore possible mechanisms of action of oxaliplatin and lysophosphatidylcholine 18:1 whose levels are increased after oxaliplatin treatment. Low temperature (5 °C) decreased the amplitude of agonist-evoked membrane current responses and slowed down their deactivation. Analysis of single-channel recordings revealed increased open probability of the channel as well as prolonged mean open dwell time and reduced mean closed dwell time upon cooling. The highest temperature sensitivity of the gating of the channel was approximately between 16–11 °C with the corresponding value of the temperature coefficient $Q_{10} \sim 0,04$. The cold sensitivity of the channel is affected by the interaction with STIM1 and is regulated via $G_{q/11}$ -protein coupled signalling pathway. Acute administration of oxaliplatin has a transient inhibitory effect on TRPC5, while 24-hour incubation in oxaliplatin increases channel activity. TRPC5 could be one of the ion channels associated with oxaliplatin-induced cold hypersensitivity.

Keywords: TRPC5, cold, cold activation, PKC, STIM1, oxaliplatin, oxaliplatin-induced peripheral neuropathy

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod.....	11
2 Literární přehled.....	12
2.1 TRP kanály.....	12
2.2 TRPC5 kanál	12
2.2.1 Regulace aktivity TRPC5	15
2.2.1.1 Chladová aktivace.....	16
2.2.1.2 Ca ²⁺ -závislá regulace	16
2.2.1.3 Regulace aktivity TRPC5 signálními drahami	18
2.2.1.4 Regulace TRPC5 lipidy	19
2.2.2 Fyziologický význam TRPC5	20
2.3 Detekce chladových podnětů (termorecepce)	21
2.3.1 Chladem aktivované iontové kanály.....	22
2.3.2 Patofyziologické vnímání chladu	23
2.4 Oxaliplatinou vyvolaná periferní neuropatie (OIPN).....	24
2.4.1 Nežádoucí účinky oxaliplatiny	24
2.4.2 Mechanizmy vzniku OIPN	25
2.4.3 Možná úloha TRPC5 při vzniku OIPN.....	28
3 Cíle práce	29
4 Materiál a metody	30
4.1 Příprava roztoků	30
4.2 Cílená mutageneze	31
4.3 Transfekce HEK293T buněk.....	33
4.4 Elektrofyzilogická měření	34
4.5 Měření změn koncentrací intracelulárního Ca ²⁺	35
4.6 Molekulární modelování	35
4.6.1 Hledání vazebného místa pro LPC 18:1	37
4.6.2 Akutní účinek oxaliplatiny	38
4.7 Výpočty a statistika, vyhodnocení dat.....	38
5 Výsledky	42
5.1 Chladem modulovaná aktivace TRPC5 iontového kanálu.....	42
5.1.1 Chlad snižuje amplitudu proudové odpovědi a zpomaluje její deaktivaci	42
5.1.2 Chlad snižuje amplitudu jednotkových proudových odpovědí.....	43
5.1.3 Chlad prodlužuje dobu otevření a zkracuje dobu zavření.....	45
5.1.4 Pravděpodobnost otevření se zvyšuje s klesající teplotou.....	46

5. 1. 5	WT TRPC5 je vysoce teplotně citlivý	46
5. 1. 6	Chlad potencuje odpovědi na aktivátory TRPC5	47
5. 2	Vliv signalizačních drah na chladovou citlivost TRPC5.....	48
5. 2. 1	Zapojení fosforylačního místa T970 v chladové aktivaci TRPC5.....	48
5. 2. 2	Termodynamická analýza chladové aktivace T970A TRPC5	50
5. 2. 3	Chladová citlivost TRPC5 závisí na interakci s endogenním STIM1	51
5. 2. 4	Termodynamická analýza chladové aktivace D652K/E653K TRPC5	53
5. 2. 5	Nadměrná exprese STIM1 naruší chladovou citlivost TRPC5.....	53
5. 2. 6	Termodynamická analýza chladové aktivace TRPC5 koexprimovaného se STIM1...	55
5. 3	Vliv oxaliplatin na aktivitu TRPC5.....	55
5. 3. 1	Inhibiční účinek akutní aplikace oxaliplatin na TRPC5	55
5. 3. 2	Inkubace v oxaliplatině zvyšuje aktivitu TRPC5	57
5. 3. 3	Molekulární modelování.....	58
5. 3. 3. 1	Blokující účinek oxaliplatin	58
5. 3. 3. 2	Hledání vazebného místa pro LPC 18:1	59
6	Diskuze	64
6. 1	Chladem modulovaná aktivace TRPC5 iontového kanálu	64
6. 2	Vliv signalizačních drah na chladovou citlivost TRPC5.....	65
6. 3	Vliv oxaliplatin na aktivitu TRPC5.....	66
6. 4	Vliv LPC 18:1 na aktivitu TRPC5	67
7	Závěr	69
8	Zdroje.....	70
	Příloha 1	80

Seznam zkratek

ARD	doména ankyrinových repetit
ATP	adenosintrifosfát
BAPTA	1,2-bis(o-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Ca _v kanál	napětím řízený vápníkový kanál
CIPN	chemoterapií indukovaná periferní neuropatie
CNG	iontový kanál aktivovaný cyklickými nukleotidy
CNS	centrální nervový systém
DAG	1,2-diacylglycerol
DACH-platina	cyklohexan-1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> -diamin platina
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfáty
DRG	zadní míšní kořeny
EA	(-)-englerin A
EC	extracelulární prostor
ECS 1/2	extracelulární roztok 1/2
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
FTS	fetální telecí sérum
GPCR	receptor spřažený s G-proteiny
GPF	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosintrifosfát
H1(R)	histaminový receptor 1
H1-H7	α -helixy 1-7
HCN1	hyperpolarizací aktivovaný cyklickými nukleotidy řízený kanál 1
HEK293T	lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T
HEPES	kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová
hTRC5	lidský ortolog receptoru TRPC5
I/V charakteristika	proudově-napěťová charakteristika
IB4	isolektin B4
IC	intracelulární prostor
ICS	intracelulární roztok
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát
IP3R	receptory pro inositoltrifosfát
K _{Ca}	Ca ²⁺ -aktivovaný draslíkový kanál
LB médium	kultivační médium pro bakterie
LHD	linker-helix doména
LJ potenciál	Lennardův-Jonesův potenciál
LPC	lysofosfatidylcholin

LPI	lysofosfatidylinositol
M ₁ (R)	muskarinový receptor 1
M ₃ (R)	muskarinový receptor 3
MATra	magnetem asistovaná transfekce
MD	molekulární dynamika
mtDNA	mitochondriální DNA
mTRPC5	myší ortolog receptoru TRPC5
Nav1.7	napětím řízený sodíkový kanál 1.7
Nav1.8	napětím řízený sodíkový kanál 1.8
Nav1.9	napětím řízený sodíkový kanál 1.9
NHERF1/2	Na ⁺ /H ⁺ výměník 1/2 (z angl. Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor 1)
NP _o	pravděpodobnost otevření N počtu kanálů
NPT	systemu s konstantním tlakem a teplotou
OIPN	oxaliplatinou vyvolaná periferní neuropatie
OXA	oxaliplatina
P1–P2	pórový helix
P ₂₅	pravděpodobnost otevření kanálu při 25 °C
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDB	proteinová databanka
PGPC	1-palmitoyl-2-glutaroyl-fosfatidylcholin
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
P _{max}	maximální pravděpodobnost otevření kanálu
P _o	pravděpodobnost otevření kanálu
POPC	1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholin
POVPC	1-palmitoyl-2-oxoaleroyl-fosfatidylcholin
Q ₁₀	teplotní koeficient
RMSD	střední kvadratická odchylka
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTK	tyrozinkinázový receptor
S1P	sfingosin-1-fosfát
S1–S6	transmembránové α-helixy 1–6
SEM	střední chyba průměru
SOAR	vazebná doména (z angl. STIM1 Orai1-activating region)
SOCE	vstup Ca ²⁺ řízený vyčerpáním vnitřních zásob Ca ²⁺
STIM1	Ca ²⁺ -citlivý protein (z angl. stromal interaction molecule 1)
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA pufr
ThermoTRP	TRP kanály aktivované změnou teplot
TMD	transmembránová doména
TRAAK	draslíkový kanál (z angl. TWIK-related arachidonic acid activated K ⁺ channel)
TREK1	draslíkový kanál (z angl. TWIK-related K ⁺ channel 1)

TREK2	draslíkový kanál (z angl. TWIK-related K ⁺ channel 2)
TRESK	draslíkový kanál (z angl. TWIK-related spinal cord K ⁺ channel)
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	tranzientní receptorový potenciálový protein
<i>TRPA1</i>	gen kódující TRPA1 protein
TRPA1	ankyrinový tranzientní receptorový potenciálový kanál 1
TRPC1–7	kanonický tranzientní receptorový potenciálový kanál 1–7
<i>TRPC5</i>	gen kódující TRPC5 protein
TRPM1–8	melastatinový tranzientní receptorový potenciálový kanál 1–8
<i>TRPM8</i>	gen kódující TRPM8 protein
TRPML	mukolipinový tranzientní receptorový potenciálový kanál
TRPP	polycystinový tranzientní receptorový potenciálový kanál
TRPV1–6	vaniloidní tranzientní receptorový potenciálový kanál 1–6
TRPY1	kvasinkový tranzientní receptorový potenciálový kanál
UniProt	databáze proteinových sekvencí
UV	ultrafialové (záření)
VSLD	senzorová doména (z angl. voltage sensing-like domain)
WT	přírozený typ
w/v	hmotnostní koncentrace

Zkratky zmíněných aminokyselin

A	alanin
C	cystein
D	kyselina asparagová
E	kyselina glutamová
G	glycin
I	izoleucin
K	lysin
L	leucin
N	asparagin
Q	glutamin
R	arginin
T	threonin
V	valin

1 Úvod

Teplotně aktivované TRP (tranzientní receptorové potenciálové) iontové kanály vyskytující se na membránách primárních aferentních senzoričkových neuronů jsou významné transdukční biomolekuly, které přenáší informace o změnách teploty z periferie do centrálního nervového systému. TRPC5 je jedním ze sedmi členů podrodiny kanonických TRP receptorů (z angl. canonical) a s prahem pro teplotní aktivaci pohybujícím se mezi 25 až 37 °C (Zimmermann et al., 2011) se řadí mezi chladem aktivované receptory. TRPC5 se účastní různých fyziologických i patofyziologických procesů, včetně detekce bolestivého chladu v odontoblastech (Bernal et al., 2021) a vzniku periferní neuropatie vyvolané chemoterapií (Sadler et al., 2021). Přesná fyziologická úloha TRPC5 není dostatečně popsána a pro její pochopení je nezbytné porozumět základním aktivačním vlastnostem TRPC5 v rámci celého organismu i v heterologních expresních systémech. Nedávno publikované struktury TRPC5 v různých konformačních stavech (Duan et al., 2019; Song et al., 2021; Wright et al., 2020) výrazně napomůžou při studiu strukturně-funkčních vztahů.

TRPC5 je aktivován řadou fyzikálních a chemických podnětů a mimo to je jeho aktivita modulována také v souvislosti se spuštěním některých signálních drah zahrnujících stimulaci fosfolipázy C (PLC) a regulaci intracelulárních hladin vápenatých iontů. Ve snaze objasnit, zda by mohla být schopnost teplotní aktivace TRPC5 kanálu ovlivněna některými komponentami vybraných signálních drah, se tato diplomová práce zaměřuje na popis kinetiky chladové aktivace lidského TRPC5 receptoru přirozeného typu a jeho konstruktů. Je zde prozkoumán účinek fosforylace kanálu prostřednictvím proteinkinázy C (PKC) a vliv interakce s Ca^{2+} -citlivým proteinem STIM1 (z angl. stromal interaction molecule 1).

Oxaliplatinou vyvolaná periferní neuropatie (OIPN, z angl. oxaliplatin-induced peripheral neuropathy), která se nejčastěji projevuje jako chladová alodynies nebo hyperalgezie, je důležitým experimentálním modelem při výzkumu vzniku chladové bolesti. Za účelem objasnění komplexních mechanismů, které se účastní těchto patofyziologických procesů, je značná část studií zaměřena na možné zapojení TRP receptorů na senzoričkových neuronech. TRPC5 je v tomto ohledu jedním z nejméně studovaných receptorů. Část této diplomové práce se zaměřuje na popis přímého účinku oxaliplatiny a lysofosfatidylcholinu (LPC) 18:1, jehož hladina je v organismu působením oxaliplatiny významně zvýšena, na aktivitu TRPC5 kanálu exprimovaného v HEK293T buňkách.

2 Literární přehled

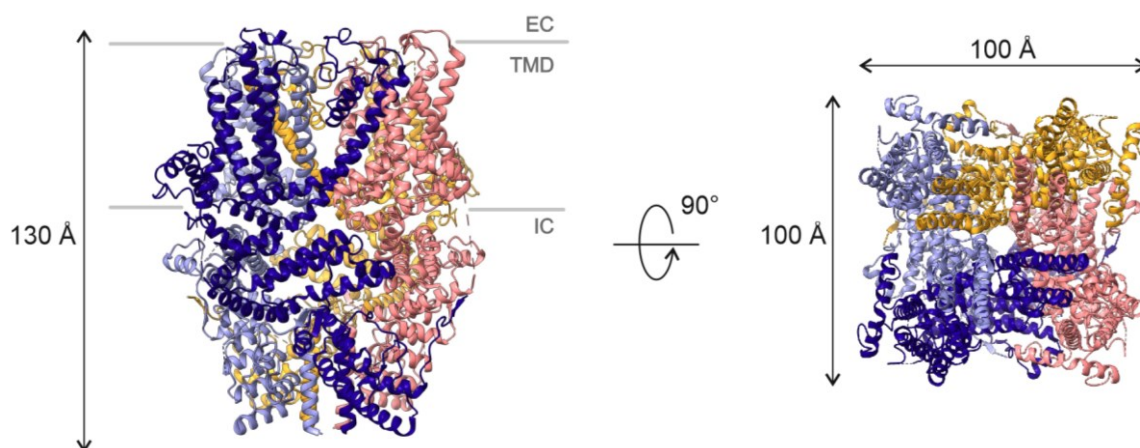
2.1 TRP kanály

Tranzientní receptorové potenciálové kanály (TRP, z angl. transient receptor potential channel) tvoří velkou rodinu TRP receptorů, která u savců zahrnuje 28 iontových kanálů rozdělených na základě sekvenční homologie do 6 podrodin (TRPC – kanonické, TRPA – ankyrinové, TRPV – vaniloidní, TRPM – melastatinové, TRPP – polycystinové, TRPML – mukolipinové). TRP receptory lze aktivovat působením široké škály exogenních i endogenních podnětů fyzikálního a chemického charakteru. Mezi typické aktivátory patří různé dráždivé substance rostlinného původu, některé mediátory zánětu, reaktivní formy kyslíku (ROS), změny membránového napětí a pH, světlo a mechanické, osmotické či tepelné podněty. TRP receptory, které jsou specificky aktivovány působením teplotních změn, se souhrnně nazývají termoTRP. Do této podskupiny se řadí iontové kanály ze 4 podrodin (TRPA, TRPC, TRPM a TRPV), které jsou aktivovány teplem a/nebo chladem v širokém teplotním rozsahu od 5 °C do 55 °C. Charakteristickou vlastností termoTRP receptorů je polymodalita, tzn. schopnost aktivace působením více podnětů různých modalit. Účinek kombinace podnětů je obvykle vyšší než součet jednotlivých účinků (synergie), přičemž aplikace chemických agonistů snižuje práh pro teplotní i napětíovou aktivaci (Vriens et al., 2014). TermoTRP kanály tak představují molekulární detektory, které integrují různé fyzikální a chemické podněty. V senzoricím systému zprostředkovávají transdukcí potenciálně nebo reálně nebezpečných stimulů, podílejí se na vnímání chutí, čichových podnětů a světla. Významnou úlohu mají termoTRP i v řadě dalších procesů, jakými je např. buněčná signalizace nebo udržení iontové homeostázy. Podrobný popis farmakologických vlastností a fyziologických funkcí termoTRP kanálů lze nalézt např. v přehledových článcích: (Nilius & Owsianik, 2011; Venkatachalam & Montell, 2007).

2.2 TRPC5 kanál

Kanonický tranzientní receptorový potenciálový kanál 5 (TRPC5) je neselektivní iontový kanál propustný pro monovalentní a divalentní kationty, s vysokou relativní propustností pro Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 9$) (Owsianik et al., 2006). Existuje 7 izoforem TRPC kanálů (TRPC1–7), přičemž TRPC2 není u lidí exprimován (Venkatachalam & Montell, 2007). Lidské TRPC kanály je možné rozdělit na dvě skupiny (TRPC1/4/5 a TRPC3/6/7), v rámci nichž jednotliví členové sdílí vysokou strukturní podobnost a některé další funkční vlastnosti (Chen et al., 2020).

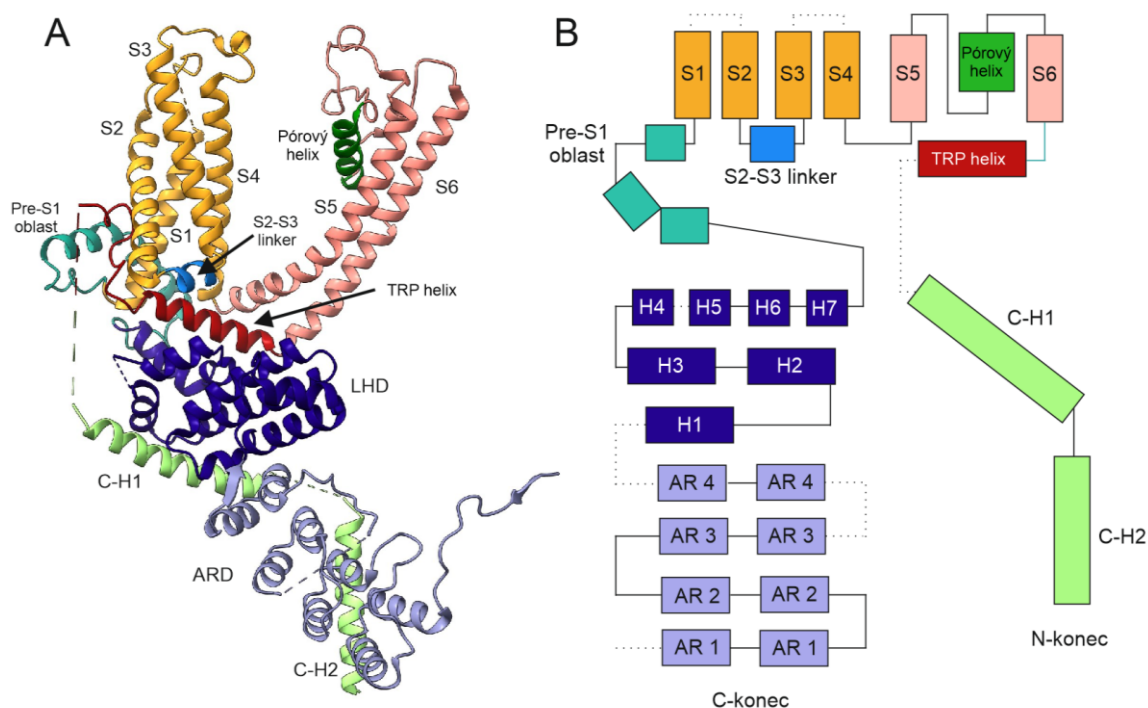
TRPC5 je exprimován převážně v centrální a v určité míře i v periferní nervové soustavě (Greka et al., 2003; Zimmermann et al., 2011). Mimo to se vyskytuje v některých orgánech, hojně např. v ledvinách (Schaldecker et al., 2013) nebo v játrech (El Boustany et al., 2008) a nalézá se také v synovii (Alawi et al., 2017) či odontoblastech (Bernal et al., 2021). Kromě lokalizace v plazmatické membráně je TRPC5 také součástí některých vnitrobuněčných membrán (De March et al., 2006; Hong et al., 2015) a extracelulárních vezikulů (Ma et al., 2014). TRPC5 se jako funkční iontový kanál vyskytuje v membránách ve formě tetramerů symetricky uspořádaných podjednotek vytvářejících centrální pór. Každá ze čtyř podjednotek se skládá ze šesti transmembránových helixů (S1–S6) a z C- a N-konce umístěných intracelulárně (Song et al., 2021) (Obr. 1). V nativních systémech tvoří TRPC5 kromě homomerů také heteromerní komplexy s TRPC1 a TRPC4 (Goel et al., 2002). Tyto různé tetramerní formy iontových kanálů (TRPC5:C1, TRPC5:C4, TRPC5:C1:C4 se liší v biofyzikálních vlastnostech, citlivosti k aktivačním podnětům, funkci i výskytu v rámci buňky, případně celého organismu (Kim et al., 2019; Myeong et al., 2016; Strübing et al., 2001).



Obr. 1 – Struktura TRPC5 receptoru. Pohled na strukturu lidského TRPC5 receptoru (Protein Data Bank ID, dále jen PDB: 7E4T) z boku (vlevo) a shora (vpravo). Každá podjednotka je znázorněna odlišnou barvou, umístění membrány je znázorněno šedými čarami. EC – extracelulární prostor, TMD – transmembránová doména, IC – intracelulární prostor. Přerušovaná čára (především v TMD) znázorňuje doposud nerozlišené oblasti. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3 podle (Song et al., 2021).

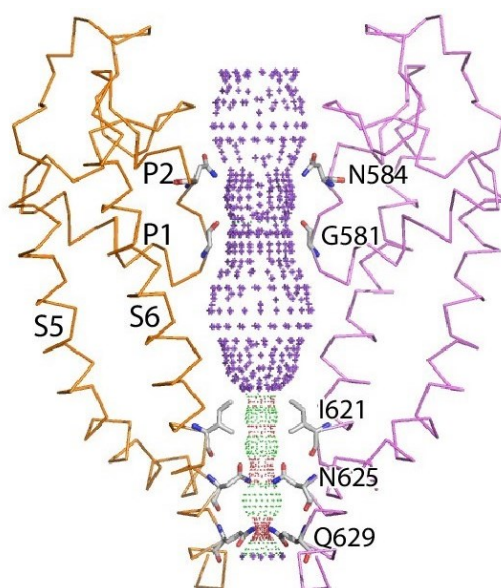
N-konec TRPC5 receptoru je tvořen ankyrinovou doménou (ARD, z angl. ankyrin repeat domain), která zahrnuje 4 ankyrinové repetice – specifický strukturální motiv přibližně 30–34 aminokyselinových zbytků uspořádaných jako helix-otáčka-helix- β -vlásenka. Na

ARD navazuje linker-helix doména (LHD, z angl. linker-helix domain) sestávající ze 7 α -helixů. Následuje transmembránová oblast TRPC5 receptoru, která zahrnuje pre-S1 oblast (tvořená pre-S1-loktem a pre-S1-helixem), helixy S1–S4 představující sensorovou doménu a helixy S5 a S6, které vytváří pórovou doménu. Helixy S2 a S3 jsou propojeny S2-S3 linkerem a mezi helixy S5 a S6 je pórový helix. Na S6 helix navazuje TRP helix. Intracelulární C-konec zahrnuje dva C-koncové helixy strukturně umístěné v blízkosti domén N-konce receptoru: LHD a ARD (Song et al., 2021) (Obr. 2).



Obr. 2 – Struktura podjednotky TRPC5. (A) Podjednotka kanálu hTRPC5 (PDB: 7E4T). Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3. (B) Schematické znázornění jedné podjednotky hTRPC5 kanálu. AR – ankyrinová repetice, H1-H7 – helixy, součást linker-helix domény, Pre-S1 oblast zahrnuje pre-S1-loket a pre-S1-helix, S1–S6 – transmembránové helixy, C-H1-2 – C-koncové helixy. Doposud nerozlišené části jsou značeny přerušovanou čarou. Upraveno podle (Duan et al., 2019).

Pórová oblast je tvořena centrálně uspořádanými S5–S6 helixy a pórovými helixy z každé ze čtyř podjednotek. Propustnost iontů je dána specifickými aminokyselinovými zbytky, které tvoří selektivní filtr a spodní vrátka póru. V horní části se nachází konzervované záporně nabitě reziduum G581, které společně s N584 vytváří selektivní filtr. Spodní vrátka póru jsou tvořena rezidui I621, N625 a Q629 nacházejícími se v nejužší oblasti póru (Duan et al., 2019; Song et al., 2021) (Obr. 3, str. 15).



Obr. 3 – Pórová oblast TRPC5 kanálu v nevodivém stavu. Různými barvami jsou zobrazeny dvě protilehlé podjednotky lidského TRPC5 (PDB: 7D4P) s vyznačenými klíčovými rezidui G581, N584 (selektivní filtr) a I621, N625, Q629 (spodní vrátka póru). S5–S6 – transmembránové helixy, P1–P2 – pórový helix. Oblast póru, jíž mohou procházet kationty, je znázorněna tečkovaně. Převzato ze (Song et al., 2021).

2. 2. 1 Regulace aktivity TRPC5

TRPC5 byl zařazen v roce 2011 do skupiny termoTRP kanálů na základě studie, která ho identifikovala v periferním nervovém systému jako chladový receptor zodpovídající za regionální teplotní adaptaci v rozsahu 37–25 °C (Zimmermann et al., 2011). Nedávno byla potvrzena úloha TRPC5 v detekci bolestivého chladu ($<15 \pm 1^\circ\text{C}$) *in vivo* v primárních senzoryckých neuronech a v odontoblastech u myši (Bernal et al., 2021; Sadler et al., 2021). TRPC5 je kromě chladu aktivován také mechanickými podněty (Gomis et al., 2008), snížením pH vnějšího i vnitřního prostředí (Cui et al., 2011) a je regulován i v souvislosti s různými fyziologickými a patofyziologickými procesy včetně změny intracelulární koncentrace vápenatých iontů a redoxního stavu buňky (Gross et al., 2009; Yoshida et al., 2006). TRPC5 může být také aktivován prostřednictvím signalizačních kaskád receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs) případně tyrosinkinázových receptorů (RTKs) (Schaefer et al., 2000). Vliv na jeho aktivaci mají také některé lipidy, Zn^{2+} , Pb^{2+} a nízké koncentrace La^{3+} a Gd^{3+} (Flemming et al., 2006; Jung et al., 2003; Park et al., 2019; Sukumar & Beech, 2010). TRPC5 sdílí společně s ostatními členy TRP rodiny částečnou strukturní podobnost s některými napětově řízenými iontovými kanály (např. Na_v , K_{Ca} ,

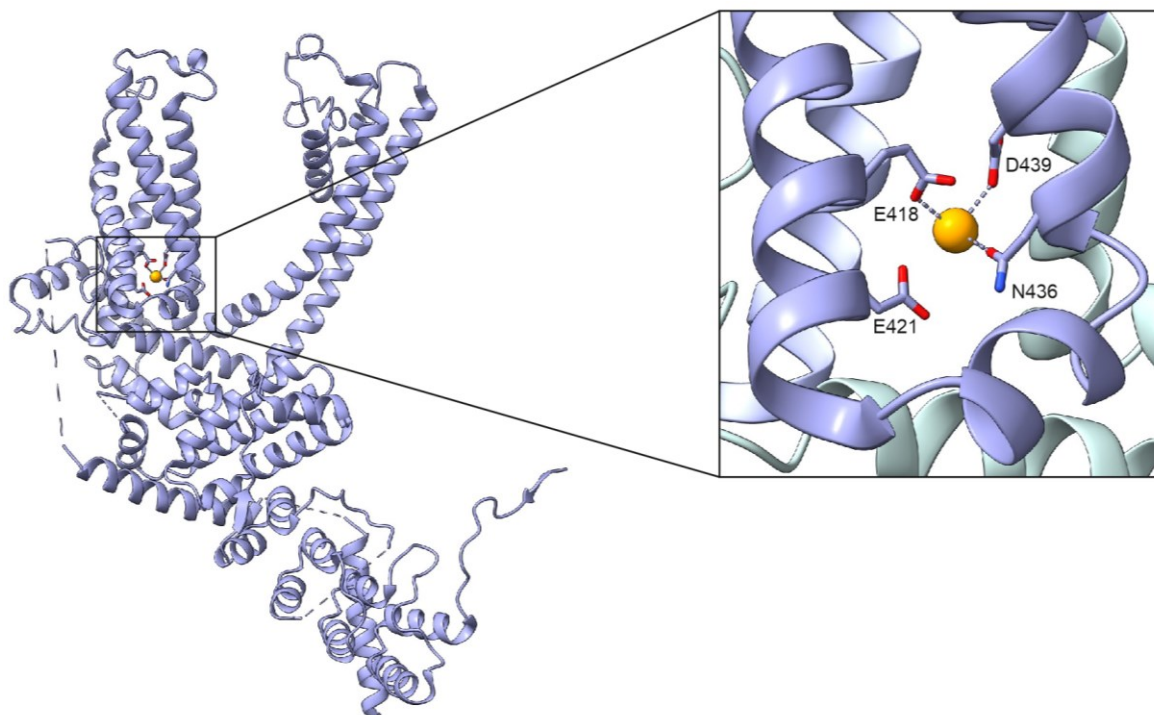
HCN, CNG) (Yu et al., 2005). Schopnost aktivace změnami membránového potenciálu byla popsána u některých TRP receptorů včetně TRPC5, napěťová závislost je však v porovnání s napěťově řízenými kanály nižší a uplatňuje se až při potenciálech překračujících fyziologické hodnoty (Zheng, 2013). TRPC receptory, které se svou strukturou nejvíce podobají napěťově řízeným K^+ kanálům (K_v), postrádají jejich typický napěťový sensor tvořený transmembránovým segmentem S4 s několika kladně nabitými rezidui (Long et al., 2007), což je považováno za jednu z možných příčin nižší napěťové citlivosti (Zheng, 2013). Změny napětí jsou u TRPC receptorů pravděpodobně převáděny pomocí sensorové domény, tzv. voltage sensing-like domain (VSLD) tvořené prvními čtyřmi transmembránovými helixy (S1–S4) (Wright et al., 2020). Proces aktivace a deaktivace TRPC5 je možné rozdělit do čtyř fází, během kterých kanál vykazuje odlišné biofyzikální vlastnosti a reverzibilně přechází ze stavu napěťové závislosti do stavu, kdy je na napětí nezávislý (Obukhov & Nowycky, 2008).

2. 2. 1. 1 Chladová aktivace

Chladová citlivost byla poprvé prokázána u myšího ortologu TRPC5 exprimovaného v HEK293 buňkách metodou terčíkového zámku snímáním proudů z celé buňky. Buněčná linie navíc stabilně exprimovala muskarinový receptor M_1 , který je spřažen s $G_{q/11}$ signální drahou. Aktivace TRPC5 byla vyvolána snížením teploty pod 37 °C. Proudové odpovědi byly nejvyšší při 25 °C a zůstaly neměnné v rozsahu fyziologicky relevantních potenciálů od –40 do –80 mV. V přítomnosti agonisty muskarinového receptoru karbacholu, nebo lanthanitých iontů byly chladové odpovědi senzitivovány. Chladová aktivace byla pozorována u homomerních forem TRPC5, nikoliv však u TRPC1/C5 heteromerů (Zimmermann et al., 2011).

2. 2. 1. 2 Ca^{2+} -závislá regulace

Jedním z důležitých endogenních regulátorů TRPC5 jsou vápenaté ionty. K aktivaci receptoru dochází následkem zvýšení jejich extracelulární i intracelulární koncentrace, přičemž příliš vysoká hladina Ca^{2+} vede naopak k inhibici TRPC5 (Blair et al., 2009; Gross et al., 2009; Zeng et al., 2004). Jakými mechanismy se vápenaté ionty podílí na regulaci TRPC5 zatím není zcela objasněno. Nedávnou studií bylo odhaleno aktivační kationtové vazebné místo v sensorové doméně receptoru mezi S2 a S3 helixy, kde je vazba Ca^{2+} koordinována rezidui E418, E421, N436 a D439 u myšího ortologu a rezidui E418, N436 a D439 u lidského ortologu (Duan et al., 2019; Song et al., 2021) (Obr. 4, str. 17).



Obr. 4 – Kationtové vazebné místo TRPC5 pro Ca^{2+} . Schematické znázornění jedné podjednotky hTRPC5 (vlevo), detail sensorové domény s vazebným místem pro Ca^{2+} , vyznačena jsou klíčová rezidua E418 a E421 (součástí helixu S2) a D439 a N436 (součástí helixu S3) (PDB: 7E4T). Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3 a upraveno podle (Song et al., 2021).

V jiné strukturální studii bylo potvrzeno analogické aktivační vazebné místo u TRPC3 a TRPC6 kanálů, a navíc byla identifikována další dvě různá vazebná místa pro Ca^{2+} v cytoplazmatické oblasti a popsána jejich funkční úloha (Guo et al., 2022). Na základě sekvenční homologie a strukturální podobnosti lze předpokládat, že jedno z těchto míst, které působí inhibičně a je lokalizované mezi druhou ankyrinovou repeticí a záporně nabitou oblastí vertikálního helixu C-konce (rezidua D749 a E81), může mít analogickou úlohu i u TRPC5. Z extracelulární strany senzitivizují TRPC5 Ca^{2+} a také La^{3+} a Gd^{3+} v oblasti póru mezi helixy S5 a S6 prostřednictvím reziduí E543, E595 a E598 (Jung et al., 2003).

Významnou úlohu v regulaci aktivity TRPC5 má Ca^{2+} -senzitivní protein STIM1. Společně s vápníkovým kanálem Orai1 tvoří hlavní komponenty zajišťující vstup vápenatých iontů v reakci na jejich vyčerpání z intracelulárních zásob – tzv. SOCE (z angl. store-operated calcium entry). STIM1 se nachází v membráně endoplazmatického retikula (ER) a působí zde jako senzor vnitřního obsahu Ca^{2+} . Pokud dojde k depleci Ca^{2+} , STIM1 změní svou konformaci, což umožní tvorbu klastrů STIM1 a jejich translokaci do oblasti spojení ER s plazmatickou membránou a následné otevření Ca^{2+} -permeabilních kanálů Orai1 a

TRPC5. V důsledku zvýšené intracelulární koncentrace Ca^{2+} jsou aktivovány mechanismy, které inaktivují oba kanály, a tím zabrání dalšímu nadměrnému vtoku Ca^{2+} (Salido et al., 2009). Ukázalo se, že klastrování STIM1 může vyvolat také zvýšení teploty nad $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ nezávisle na vyčerpání Ca^{2+} z ER. Následné ochlazení vede k aktivaci kanálů Orai1 (Xiao et al., 2011). S TRPC5 interaguje STIM1 prostřednictvím cytosolické vazebné domény SOAR (z angl. STIM1 Orai1-activating region) (Lee et al., 2014) a elektrostaticky dvěma kladně nabitými lysiny (interagují se záporně nabitými rezidui TRPC5 – D652 a E653) (Lee et al., 2010).

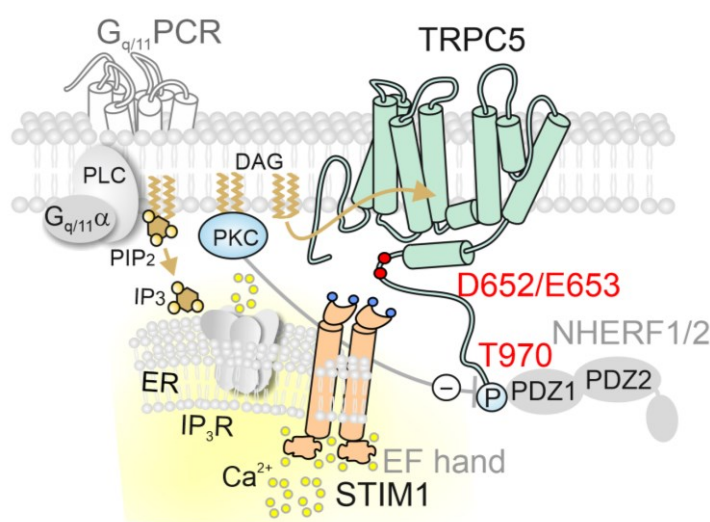
2. 2. 1. 3 Regulace aktivity TRPC5 signálními drahami

V nativních systémech je TRPC5 regulován v důsledku aktivace receptorů spřažených s G-proteiny a tyrozinkinázových receptorů (Schaefer et al., 2000). Ty spouští signální kaskády, kde jednotlivé komponenty, kromě vlivu na TRPC5 samotný, moduluji své funkce i vzájemně mezi sebou, a to se odráží na výsledné komplexitě celého děje. Pro všechny kanály z podrodiny TRPC je společná jejich aktivace prostřednictvím fosfolipázy C (PLC) – jednoho z efektorů signální dráhy $G_{q/11}$ -proteinů. PLC hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) za vzniku inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP_3) a 1,2-diacylglycerolu (DAG).

Molekulární mechanismy regulace TRPC5 fosfolipázou C zatím nejsou dostatečně objasněny. Jeden z nich zahrnuje druhého posla – IP_3 , který se váže na IP_3 receptory lokalizované v membráně ER. Spustí se tak uvolňování zásob vápenatých kationtů z ER, které v závislosti na koncentraci kanál regulují (viz kapitola 2.2.1.2).

Aktivitu TRPC5 ovlivňuje i druhý produkt štěpení PIP_2 – 1,2-diacylglycerol. DAG stimuluje protein kinázu C (PKC), která receptor desenzitizuje fosforylací. S využitím bodových mutagenéz bylo u myšního receptoru odhaleno klíčové reziduum threonin na pozici 972 (T970 u lidského ortologu), které hraje zásadní roli v tomto procesu (Zhu et al., 2005). Toto reziduum se vyskytuje na distálním C-konci TRPC5 a je součástí PDZ-vazebného motivu (VTTLR), kam se mohou vázat adaptorové proteiny NHERF1/2 (z angl. Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1) svou PDZ-doménou (Obukhov & Nowycky, 2004). Později bylo dokázáno, že právě tato interakce mezi TRPC5 a NHERF1/2, která je umožněna fosforylací threoninu 970, udržuje receptor v inaktivním stavu necitlivém k DAG. K nabytí citlivosti dochází až po narušení této vazby (Storch et al., 2017). Současně byla potvrzena a později doplněna i duální role PIP_2 . Ten interaguje s TRPC5 a síla jejich interakce se

zásadně podílí na regulaci aktivace a desenzitizace TRPC5 zprostředkované DAG. PIP₂ může být s receptorem funkčně spřažen, čímž posiluje vazbu mezi TRPC5 a NHERF1/2, udržující kanál v inaktivním stavu. Následnou deplecí PIP₂ je vyvolána konformační změna na C-konci receptoru, která vede k disociaci NHERF1/2, a TRPC5 tak může být aktivován a stává se citlivým k DAG. V případě, kdy není threonin 970 v PDZ-vazebném motivu fosforylován, a NHERF1/2 se tedy nemůže vázat na TRPC5, je silná interakce mezi TRPC5 a PIP₂ naopak důležitá pro stimulaci receptoru. Za takových podmínek je TRPC5 citlivý k DAG, který se sám podílí na posílení této interakce. Když ale DAG aktivuje PKC, a ta receptor fosforyluje, interakce mezi TRPC5 a PIP₂ je oslabena a PIP₂ se může uvolňovat do okolí, kde se postupně snižuje jeho hladina v důsledku jeho štěpení fosfolipázou C (Ningoo et al., 2021) (Obr. 5).



Obr. 5 – Regulace aktivity TRPC5 signálními drahami. Aktivaci receptorů spřažených s $G_{q/11}$ -proteiny je stimulována fosfolipáza C (PLC), která hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ může aktivovat TRPC5 prostřednictvím Ca^{2+} uvolněného z vnitřních zásob v ER stimulací IP₃ receptoru v membráně ER. DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC), která TRPC5 inhibuje fosforylací threoninu na pozici 970. Fosforylace T970 umožní vazbu s PDZ doménou proteinu NHERF1/2, který udržuje kanál v inaktivní stavu. DAG může TRPC5 aktivovat v závislosti na hladinách PIP₂. Ca^{2+} -citlivý protein STIM1 umístěný v membráně ER interaguje se záporně nabitými rezidui D652 a E653 na C-konci TRPC5. V případě vyčerpání vnitřních zásob Ca^{2+} STIM1 otevírá TRPC5.

2. 2. 1. 4 Regulace TRPC5 lipidy

Druzí poslové vznikající prostřednictvím výše uvedených signálních kaskád (PIP₂ a DAG) nejsou jedinými látkami lipidového charakteru, které mohou aktivovat TRPC5. Ně-

které další lipidy případně jejich deriváty se na regulaci iontového kanálu podílejí různými mechanismy, ať už jako extracelulární nebo intracelulární signální molekuly, nebo svým výskytem v membráně (Beech, 2012). Určité látky lipidové povahy jsou agonisty GPCRs/RTKs a kanál tak aktivují prostřednictvím signálních drah. Jiné pak mohou modlovat TRPC5 nepřímo ovlivněním vlastností membrány v jeho okolí a konečně existují i specifická vazebná místa na TRPC5, kde mohou lipidy přímo interagovat. Strukturní studie na myším i lidském TRPC5 odhalily několik takových míst v transmembránové oblasti především mezi senzorem (S1–S4) a pórovou (S5–S6) doménou (Duan et al., 2019; Song et al., 2021). Kromě PIP₂ a DAG může být TRPC5 aktivován také lysofosfatidylcholinem (LPC) v závislosti na délce jejich hydrofobního řetězce. Ten musí obsahovat minimálně 12 uhlíků, aby mohl být kanál lysofosfatidylcholinem aktivován (Flemming et al., 2006). Ačkoliv LPC mohou aktivovat i některé GPCRs (Im, 2005), pokusy s inhibitory GPCRs (GDP-β-S) a vytrženými membránovými terčiky (elektrofyzilogická měření v tzv. inside-out konfiguraci) dokazují, že mechanismus působení LPC je nezávislý na této kaskádě (Flemming et al., 2006). Mimo to byla schopnost aktivovat TRPC5 pozorována i u lysofosfatidylinositolu (LPI), sfingosinu-1-fosfátu (S1P), u gangliosidů a u oxidovaných fosfolipidů (PGPC – 1-palmitoyl-2-glutaroyl-fosfatidylcholinu a POVPC – 1-palmitoyl-2-oxoaleroyl-fosfatidylcholinu) (Al-Shawaf et al., 2010; Beech, 2012; Flemming et al., 2006).

2.2.2 Fyziologický význam TRPC5

V řadě fyziologických i patofyziologických procesů se TRPC5 jako neselektivní kationtový kanál uplatňuje v regulaci iontové homeostázy. S ohledem na množství buněčných procesů, kterých se účastní Ca²⁺, je schopnost TRPC5 propouštět vápenaté kationty, a to nejen v souvislosti s vyčerpáním vnitřních zásob (viz kapitola 2.2.1.2), naprosto klíčová.

Aktivací TRPC5 dochází k depolarizaci buněčné membrány, která pak následně může stimulovat další napěťově řízené kanály. Poruchy vápníkové homeostázy způsobené mutacemi *TRPC5*, podobně jako u některých dalších TRP kanálů (TRPM8, TRPV1, TRPC1/4/6), přispívají k rozvoji různých rakovinných onemocnění (He & Ma, 2016). Intenzivně je studována úloha TRPC5 v rozvoji kardiovaskulárního systému a ledvin (Du et al., 2021). Bylo experimentálně potvrzeno, že přítomnost a aktivace TRPC5 kanálu v synoviocytech je součástí ochranného mechanismu buněk před působením zánětlivých mediátorů vznikajících během revmatoidní artritidy (Alawi et al., 2017). V centrální nervové soustavě se TRPC5 uplatňuje při navádění axonů (Greka et al., 2003), formování

stresové odpovědi v amygdale (Ricchio et al., 2009), v procesech učení a paměti (Bröker-Lai et al., 2017) a při vývoji embryonálního mozku (He et al., 2012; Strübing et al., 2003). V nedávné době byla objevena příčina mentálního postižení způsobená mutací (R175C) v genu pro TRPC5 u lidí (Leitão et al., 2022). V periferním nervovém systému TRPC5 přispívá ke vzniku mechanické a chladové hyperalgezie u myši s experimentálně navozeným zánětem (Sadler et al., 2021) a je hlavním receptorem, který převádí informaci o působení bolestivého chladu z myších odontoblastů na periferní zakončení aferentních noci-ceptivních vláken (Bernal et al., 2021). Bylo prokázáno, že přibližně 75 % lidských senzori-ckých neuronů exprimuje TRPC5, přesná fyziologická úloha tohoto receptoru na noci-ceptivních neuronech však dosud není dostatečně popsána a vyžaduje další intenzivní vý-zkum na systémové, buněčné i molekulární úrovni.

2.3 Detekce chladových podnětů (termorecepce)

U člověka je teplota okolí nebo objektů, které jsou v přímém kontaktu s kůží, vnímána neutrálně v rozsahu 31–34 °C, v takovém případě není vyvolán vjem chladu ani tepla. S poklesem o 1 °C od tohoto intervalu je možné pociťovat nebolestivé ochlazení a průměr-ný práh pro vznik bolestivého vjemu je přibližně 12 °C (Erpelding et al., 2012; MacDonald et al., 2020)

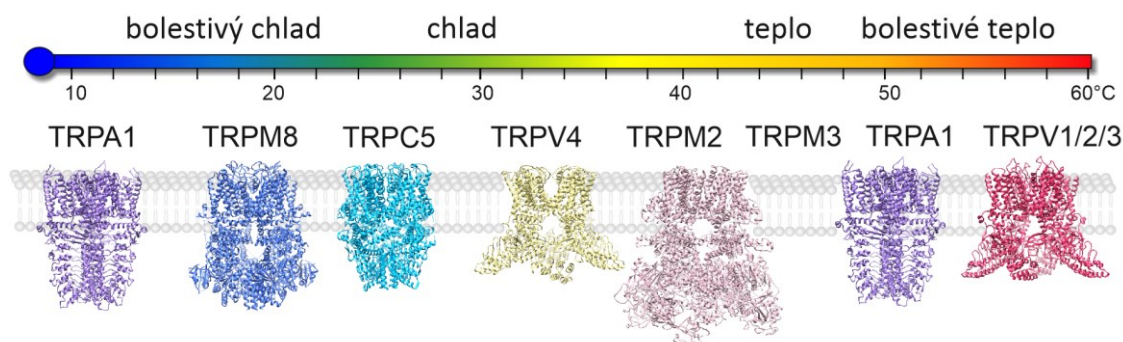
Změna teploty prostředí je detekována volnými nervovými zakončeními periferních aferentních vláken. Tyto primární senzori-cké neurony, jejichž těla se nacházejí v gangliích zadních míšních kořenů (DRG, z angl. dorsal root ganglia) a v trigeminálních gangliích, jsou polymodální, tj. reagují kromě různých teplot také na další podněty chemického či fyzikálního charakteru, přičemž typ podnětu, který bude konkrétním vláknem detekován, závisí na zastoupení specifických receptorů. Informace o působení nízkých teplot je vedena slabě myelinizovanými A δ -vláknky středního průměru (1–6 μ m) a o něco pomalejšími tenkými (0,2–1,5 μ m) nemyelinizovanými C-vláknky. Z hlediska reakce na chlad je možné rozdělit senzori-cké neurony na dvě skupiny. Neurony z první skupiny se vyznačují svou spontánní aktivitou při teplotách, které vnímáme jako neutrální, tedy 31–34 °C, a už při mírném ochlazení je přechodně zvýšena jejich aktivita. Tato vlákna vedou informace o nebolestivém chladu, proto je možné je označit jako chladové termoreceptory. Druhou skupinou jsou chladové noci-ceptory. Aktivační práh těchto neuronů je posunut k podstat-ně nižším teplotám (<12 °C). Při neutrální teplotě chladové noci-ceptory nevykazují spon-tánní aktivitu. Delší působení chladu vyvolává akční potenciály, jejichž frekvence je nižší

než u termoreceptorů. Zatímco chladové termoreceptory se při ustálení teploty poměrně rychle adaptují, u chladových nociceptorů k adaptaci nedochází (Basbaum et al., 2009; McKemy, 2012).

2.3.1 Chladem aktivované iontové kanály

Iontové kanály exprimované na povrchu primárních aferentních neuronů jsou prvními molekulárními senzory, které detekují různé podněty včetně chladu. Aktivace těchto tzv. transdukčních kanálů způsobí lokální depolarizaci buněčné membrány a následný vznik akčních potenciálů, které jsou prostřednictvím napětově aktivovaných kanálů vedeny do centrálního nervového systému, kde je umožněno zpracování této informace a spuštění obranných mechanismů (Basbaum et al., 2009).

Schopnost teplotní transdukce TRP kanálů byla poprvé popsána u kapsaicinového receptoru TRPV1, jehož aktivační práh je $>43\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). Postupně následovala identifikace dalších teplem aktivovaných kanálů: TRPV2–4, TRPA1 a TRPM2–3 (Caterina et al., 1999; Güler et al., 2002; Moparthi et al., 2016; Tan & McNaughton, 2016; Vriens et al., 2011; Xu et al., 2002). Rozsah teplot, ve kterém jsou jednotlivé termoTRP receptory aktivovány, je znázorněn schematicky na Obr. 6.



Obr. 6 – Teplotou aktivované termoTRP receptory. Přehled TRP receptorů seřazených podle vzrůstající teploty jejich aktivačního prahu. zleva: TRPA1 (PDB:6PQQ), TRPM8 (PDB: 6O77), TRPC5 (PDB: 7D4P), TRPV4 (PDB: 7AA5), TRPM2 (PDB: 6PUO), TRPM3 (zatím neexistuje struktura), TRPA1 (PDB: 6PQQ), TRPV1–3 (zobrazen TRPV3, PDB: 6MHV). Vytvořeno v programu Chimera 1.14.

Schopnost chladové transdukce se poprvé podařilo prokázat pro receptor TRPM8, který je také aktivován mentolem – látkou vyvolávající pocit chladu. TRPM8 má práh pro chladovou aktivaci přibližně $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). U myši se delece genu *TRPM8* projevuje neschopností rozeznat ochlazení v rozsahu $30\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vní-

mání poklesu teploty pod tyto hodnoty již narušeno není, což napovídá o zapojení ještě jiných chladových receptorů nebo dalších mechanismů (Bautista et al., 2007). Experimenty se selektivním blokátorem (PF-05105679) prokázaly významnou roli TRPM8 v detekci bolestivého chladu i u lidí (Winchester et al., 2014).

Jiným chladovým termoTRP receptorem je TRPA1 s prahem citlivosti okolo 10 °C (Story et al., 2003). Zapojení tohoto receptoru v detekci bolestivých nízkých teplot prokazují některé studie s využitím myších modelů (Bandell et al., 2004; Karashima et al., 2009). V jiných experimentech se však fyziologickou úlohu TRPA1 v detekci bolestivého chladu nepodařilo potvrdit (Bautista et al., 2006). Pokusy s purifikovaným lidským TRPA1 na umělých membránách potvrzují jeho citlivost jak na teploty nízké (<15 °C), tak vysoké (>30 °C) (Moparthy et al., 2016).

TRPC5 je třetím termoTRP receptorem, který byl identifikován jako chladový senzor. Chladová aktivace TRPC5 byla pozorována v expresním systému v rozsahu teplot od 37 do 25 °C. U myši s vyřazeným *TRPC5* genem však nebyla ve stejné studii prokázána žádná změna v detekci chladu, naproti tomu bylo pozorováno zvýšení exprese TRPM8 v DRG neuronech (Zimmermann et al., 2011). Teprve nedávno se podařilo potvrdit významnou účast TRPC5 v detekci chladových podnětů u myšího modelu periferní neuropatické bolesti (Sadler et al., 2021) a v myších odontoblastech (Bernal et al., 2021).

Kromě termoTRP receptorů jsou nízkými teplotami aktivovány také iontové kanály z jiných rodin. Jsou jimi např. zástupci draslíkových (TRAAK, TREK1, TREK2, TRESK) a sodíkových ($Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$) kanálů. Chladem vyvolaná aktivace byla u značné části z nich odhalena jen v *in vitro* pokusech, zatímco zapojení v senzoričtém systému je u většiny nutné teprve objasnit. Role těchto kanálů v termoreceptaci savců je shrnuta v přehledových článcích: (MacDonald et al., 2020; Vriens et al., 2014).

2. 3. 2 Patofyziologické vnímání chladu

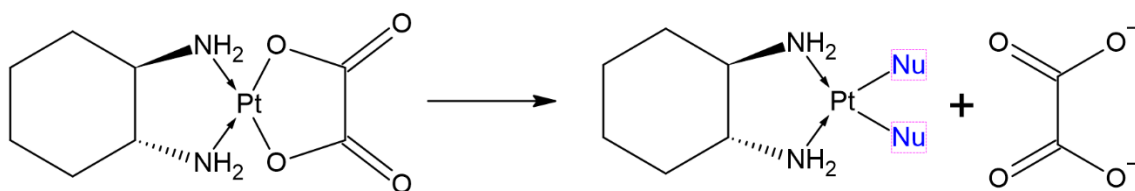
Poruchy vnímání chladu doprovází některé typy neuropatií vznikajících poškozením periferního i/nebo centrálního somatosenzoričtého nervového systému. Pacienti mohou pociťovat chladovou bolest, kterou vyvolává podnět za normálních okolností nebolestivý (chladová alodynzie), případně trpí zvýšenou citlivostí k bolestivým teplotním podnětům (chladová hyperalgezie). Významná úloha v řadě těchto procesů byla prokázána pro některé termoTRP. Mezi nejčastější příčiny patologického vnímání nízkých teplot se řadí poranění periferních nervů (Taylor et al., 2010), cévní mozková příhoda (Klit et al., 2011), zá-

nět (De Goeij et al., 2013), diabetes mellitus (Hyllienmark et al., 2009) a působení herpetického viru *varicella zoster* (Baron et al., 2009). Chladová alodynie a hyperalgezie se objevují při otravách různými toxiny (ciguatoxiny) (Zimmermann et al., 2013) a navodit je mohou také některá chemoterapeutika, jakými jsou např. paclitaxel, karboplatina a oxaliplatina (Miyano et al., 2019; Sałat, 2020). Oxaliplatinou navozená periferní neuropatie je jedním z důležitých experimentálních modelů základního výzkumu mechanismů vzniku chladové bolesti.

2. 4 Oxaliplatinou vyvolaná periferní neuropatie (OIPN)

Oxaliplatina je jedním z platinových cytostatik, které představují léky první volby v protinádorové chemoterapii obecně solidních nádorů, často i bez určení jejich lokalizace. Využívá se především při léčbě gynekologických nádorů, kolorektálního karcinomu a nádorů plic, hlavy a krku (Alcindor & Beauger, 2011; Atmaca et al., 2013; Clark et al., 2013; Wheate et al., 2010).

Mechanismus účinku oxaliplatinu spočívá ve schopnosti vytvářet adukty na DNA, čímž se mění konformace řetězce a mohou vznikat zlomy. Následkem je znemožnění replikace i transkripce a spuštění apoptózy. Po vstupu oxaliplatinu (oxaláto-1,2-diaminocyklohexan platnatého komplexu) do buňky se odštěpuje odstupující skupina – oxalát, která je následně nahrazena vodou nebo jinými endogenními nukleofily (např. Cl⁻ nebo HCO₃⁻) (Obr. 7). Vznikají tak přechodné reaktivní formy, které ochotně interagují s nukleofilní částí DNA, ale i s proteiny a dalšími makromolekulami, což bývá jednou z příčin více, či méně závažných vedlejších účinků (Johnstone et al., 2016).



Obr. 7 – Biotransformace oxaliplatinu. Po vstupu do buňky se z oxaliplatinu (oxaláto-1,2-diaminocyklohexan platnatého komplexu) odštěpuje oxalát, který je následně nahrazen endogenními nukleofily (Nu). Vytvořeno v programu ChemSketch.

2. 4. 1 Nežádoucí účinky oxaliplatinu

Mezi platinovými cytostatiky je oxaliplatina charakteristická svou relativní šetrností. I přesto ale může působit nefrotoxicky či hepatotoxicky a v souvislosti s jejím podáváním

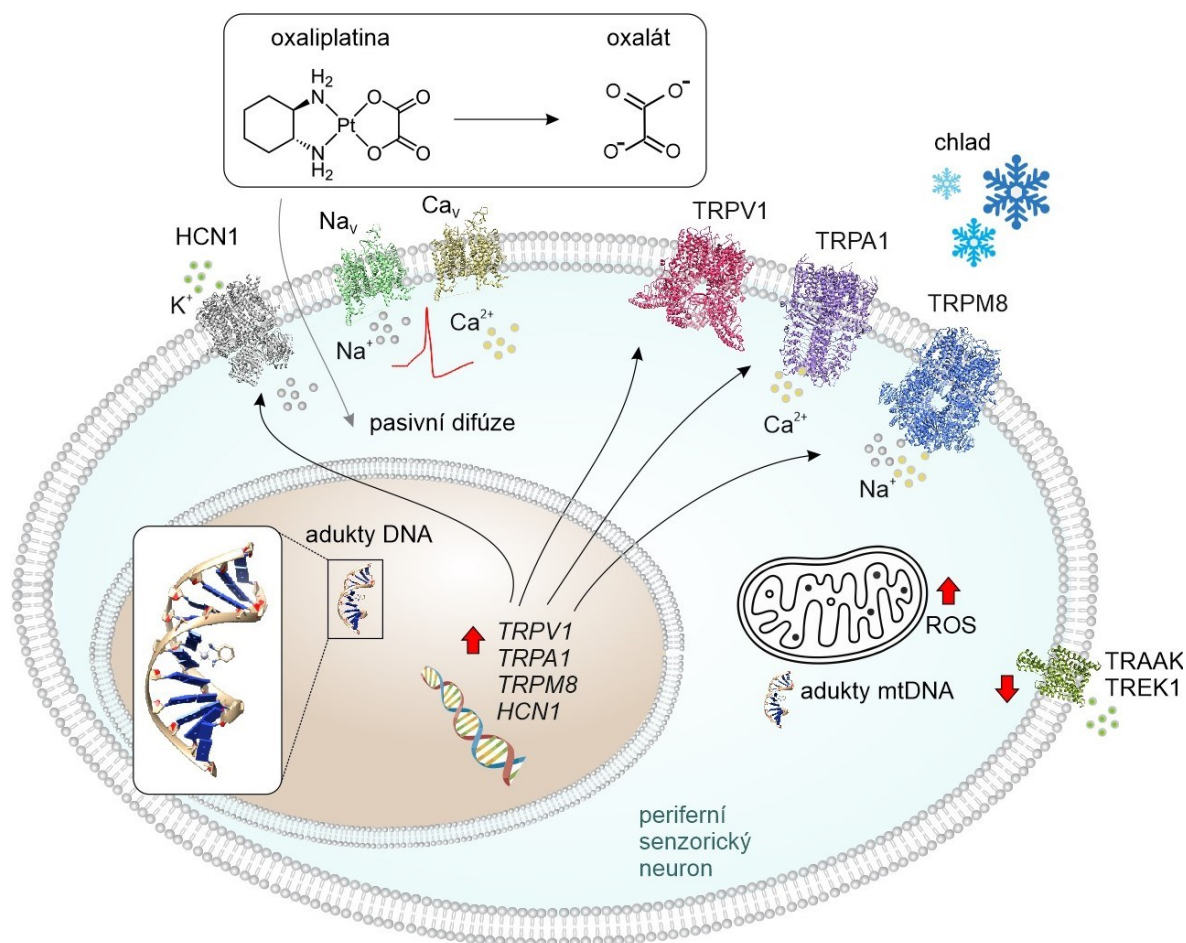
nejsou ojedinělé ani různé projevy hematologické a gastrointestinální toxicity. Hlavním nežádoucím efektem oxaliplatiny je ale neurotoxicita. Ta bývá nejčastějším faktorem limitujícím dávku a často i důvodem k ukončení léčby (Oun et al., 2018).

S aplikací oxaliplatiny je spojován vznik periferních neuropatií, které je možné rozdělit na akutní a chronické. Ty se liší molekulárním a buněčným mechanismem i klinickými projevy závisujícími na dávce a způsobu podání léčiva (Gebremedhn et al., 2018). Akutní neuropatie se objevuje již pár hodin od první aplikace a postihuje až 90 % pacientů. Mezi nejčastější příznaky patří dysestézie a/nebo parestézie v distálních částech končetin, které bývají vyvolány a zhoršeny chladem. Často jsou postiženy také oblasti krku nebo okolí úst a objevují se i potíže s polykáním a zkrácený dech. Tyto projevy se obvykle ztrácí do několika dnů, ale s narůstajícím počtem cyklů chemoterapie se prodlužuje doba jejich trvání (Pachman et al., 2015). Chronická fáze, během níž se ještě přidávají poruchy propriocepce, pravděpodobně souvisí s akumulací oxaliplatiny v DRG neuronech a některých orgánech (Wei et al., 2021). Příznaky neurotoxicity většinou úplně vymizí do pár měsíců od ukončení léčby, v určitých případech ale mohou přetrvávat i několik let (Pachman et al., 2015).

2. 4. 2 Mechanizmy vzniku OIPN

Při vzniku periferní neuropatie vyvolané oxaliplatinou je ovlivněno množství procesů na buněčné i molekulární úrovni. Jedním z prvních je změna míry exprese a funkce některých napětově řízených iontových kanálů. Výsledkem je zvýšení excitability neuronů a narušení iontové homeostázy. Významná role při navození chladové alodynies byla potvrzena u Na_v 1.6 kanálů, které oxaliplatina aktivuje (Deuis et al., 2013). Za vznikem chladové přecitlivělosti stojí také snížení exprese draslíkových TRAAK a TREK1 a zvýšení exprese HCN1 kanálů v DRG neuronech (Descoeur et al., 2011). Oxaliplatina také mění hladiny Ca^{2+} ovlivněním některých Ca_v kanálů (Schmitt et al., 2018) a produkcí chelatačního činidla – oxalátu (Sakurai et al., 2009). Narušena může být i funkce mitochondrií vedoucí ke zvýšení oxidativního stresu a příčinou periferních neuropatií je také spuštění různých imunitních reakcí, poškození DNA, změna funkcí membránových přenašečů a degenerace axonů (Di Cesare Mannelli et al., 2013; Ogihara et al., 2019). Vlivem oxaliplatiny začínají informaci o chladu přenášet i senzorké neurony, které se za normálních okolností na detekci nízkých teplot nepodílí (MacDonald et al., 2021). Popis klíčových mechanismů shrnují přehledové články: (Kang et al., 2021; Sałat, 2020; Starobova & Vetter, 2017).

Ve snaze objasnit podstatu neurologické toxicity spojené s poruchami chladového čítí se výzkumy zaměřují také na skupinu termoTRP receptorů hojně exprimovaných v DRG a v trigeminálních neuronech. Vlivem oxaliplatin se zvyšuje množství TRPA1, TRPV1 a TRPM8 (Chukyo et al., 2018). Zapojení TRPA1 a TRPM8 při vzniku chladové alodynzie a hyperalgezie bylo potvrzeno na zvířecích modelech s vyřazenými *TRPM8* a *TRPA1* geny a s využitím selektivních antagonistů (Descœur et al., 2011; Nassini et al., 2011). TRP receptory mohou být regulovány některými výše uvedenými mechanizmy. Např. TRPA1 je aktivován při zvýšení oxidativního stresu (Miyake et al., 2017). Oxaliplatin snižuje intracelulární pH, čímž se také podílí na aktivaci TRPA1 (Riva et al., 2018). V její přítomnosti stoupá koncentrace lysofosfatidylcholinů (LPC 16:0 a LPC 18:1), které aktivují TRPV1 a TRPM8 v DRG neuronech (Rimola et al., 2020). Prostřednictvím aktivace TRPA1 a TRPM8 vyvolává oxaliplatin depolarizaci specifické skupiny IB4⁻ neuronů (neurony, které nevážou rostlinný isolektin B4), což vede ke zvýšení excitability (Wu et al., 2021). TRPM8 je působením oxaliplatin nejdříve aktivován (měřeno 1 h od aplikace) a do 24 h desenzitizuje. Důvodem je spuštění PLC signální dráhy, kdy je štěpen PIP₂ a stimulována PKC, která následně TRPM8 inhibuje (Rimola et al., 2021). Experimenty dokazují také aktivaci TRPV1 následkem stimulace G_q proteinů oxaliplatinou prostřednictvím H1 histaminového receptoru (Potenzieri et al., 2020) (Obr. 8, str. 27).



Obr. 8 – Mechanizmy vzniku periferní neuropatie vyvolané oxaliplatinou. Metabolity oxaliplatinu ovlivňují funkci a expresi iontových kanálů a zvyšují excitabilitu periferních neuronů prostřednictvím napěťově řízených sodíkových (Na_v) a vápníkových (Ca_v) kanálů. Vlivem oxaliplatinu se zvyšuje exprese kanálů HCN1, TRPA1, TRPM8 a TRPV1, zatímco se snižuje exprese kanálů TRAAK a TREK1. Cytostatický účinek oxaliplatinu spočívá ve schopnosti vytvářet adukty na DNA, a tím znemožnit replikaci a transkripci. Vznik aduktů na mitochondriální DNA vede k narušení jejich funkce a ke zvýšení oxidativního stresu.

S ohledem na doposud objasněné mechanismy vzniku periferních neuropatií probíhá řada klinických studií¹ testujících látky potenciálně schopné zmírnit toxický vliv oxaliplatinu. Zatím jediným lékem doporučeným Americkou společností pro klinickou onkologii k léčbě bolestivých neuropatií vyvolaných chemoterapií (CIPN, z angl. chemotherapy-induced peripheral neuropathy) obecně je duloxetin (Loprinzi et al., 2020), inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu, který působí na centrální i periferní nervovou soustavu. Mechanismus účinku duloxetinu v případě CIPN však zatím není dostatečně popsán. Byl pozorován jeho inhibiční vliv na iontové kanály, např. na TRPM2, TRPM8

¹ <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=oxaliplatin&cond=Peripheral+Neuropathy+Due+to+Chemotherapy>

(Toda et al., 2019) i TRPC5 (Zimova et al., 2022) a na některé Na⁺ kanály (Stoetzer et al., 2016), což by mohlo být molekulárním podkladem působení duloxetinu na snížení aktivity nociceptivních neuronů.

2. 4. 3 Možná úloha TRPC5 při vzniku OIPN

Vliv oxaliplatinu na aktivitu případně na míru exprese samotného TRPC5 zatím nebyl dostatečně zkoumán. Nicméně některé z mechanismů toxického působení oxaliplatinu pozorované u jiných termoTRP kanálů (TRPA1, TRPM8, TRPV1 a TRPV4) mohou působit analogicky i v případě TRPC5. Zatím jen jediná studie zkoumala možnou úlohu TRPC5 *in vivo*, společně s úlohou TRPA1 a TRPM8, při vzniku akutní chladové alodynii vyvolané oxaliplatinou, a to na myším modelu s využitím farmakologické inhibice nebo vyřazením genu pro příslušný kanál, přičemž zapojení nebylo prokázáno ani u jednoho z nich (Deuis et al., 2013). Přímý účinek oxaliplatinu na TRPC5 v heterologním expresním systému zatím nebyl v literatuře popsán.

3 Cíle práce

1. Pomocí elektrofyziologických metod vymezit teplotní podmínky, při kterých dochází k teplotně závislé aktivaci rekombinantního lidského TRPC5 a popsat parametry této aktivace.
2. Prozkoumat možné zapojení významných signálních drah v regulaci aktivity TRPC5 vyvolané chladem s využitím mutantních konstruktů a společnou expresí TRPC5 s proteinem STIM1.
3. Popsat vliv akutního a dlouhodobého působení oxaliplatinu na aktivitu TRPC5 pomocí elektrofyziologických metod a charakterizací změn intracelulární koncentrace vápenatých iontů.
4. Metodami molekulárního modelování navrhnout možný mechanismus regulace aktivity lidského TRPC5 oxaliplatinou a LPC 18:1. Na základě výsledků molekulárně-dynamických simulací prověřit pomocí elektrofyziologických metod s využitím bodové mutagenese možné místo interakce LPC 18:1 s TRPC5.

4 Materiál a metody

4.1 Příprava roztoků

Všechny použité chemikálie byly pořízeny od společností Sigma-Aldrich a Merck, pokud není uvedeno jinak. Pepton z kaseinu a extrakt z kvasinek byly zakoupeny u SERVA Electrophoresis, Nutrient Agar No.2 u HiMedia Laboratories a LPC 18:1 u Avanti Polar Lipids.

Roztoky pro horizontální elektroforézu a kultivaci buněk

Složení roztoků pro horizontální elektroforézu (TAE pufr – Tris-acetát-EDTA) a pro kultivaci buněk (PBS, Versenův roztok a LB médium) bylo: **TAE pufr** (2M Tris, 1M kys. octová, 50mM EDTA), **PBS** (1,47mM KH₂PO₄; 4,3mM Na₂HPO₄; 137mM NaCl; 2,7mM KCl; pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,3), **Versenův roztok** (PBS; 87μM trypsinu; 0,68mM EDTA; pH = 7,3), **LB médium** (1% (w/v) pepton; 0,5% (w/v) extrakt z kvasinek; 0,26M NaCl). Roztoky byly skladovány v lednici při 2–5 °C.

Extracelulární a intracelulární roztoky

Během elektrofyziologických měření (whole-cell konfigurace) a při měření změn hladin koncentrace intracelulárního Ca²⁺ byly buňky umístěny v misce s extracelulárním roztokem **ECS 1** (160mM NaCl; 2,5mM KCl; 1mM CaCl₂; 2mM MgCl₂; 10mM HEPES; 10mM glukóza; pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,3). Skleněná pipeta s měřicí elektrodou byla naplněna intracelulárním roztokem **ICS** (5mM EGTA; 3mM CaCl₂; 145mM CsCl; 2mM MgATP; 10mM HEPES; pH bylo upraveno pomocí CsOH na hodnotu 7,3). Elektrofyziologická měření jednotkových proudů (cell-attached konfigurace) byla prováděna v extracelulárním roztoku **ECS 2** (140mM NaCl; 5mM CsCl; 2mM MgCl₂; 2mM CaCl₂; 10mM HEPES; 10mM glukóza; pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,4). Jednotlivé složky byly smíchány v destilované vodě, přefiltrovány přes sterilní filtr (0,22 μM) a skladovány v mrazáku (–18 °C). Před zahájením experimentu byly roztoky zahřáty na teplotu v místnosti.

Roztoky aktivátorů

Zásobní roztoky (–)englerinu A (EA), LPC 18:1 a karcholu byly připraveny rozpuštěním EA v DMSO, LPC 18:1 v ethanolu (99,8%) a karcholu v destilované vodě. Tyto zásobní roztoky byly skladovány v mrazáku při –80 °C (EA, LPC 18:1) a –18 °C (karchol).

chol). Před zahájením experimentu byly roztoky naředěny v příslušném extracelulárním roztoku na požadovanou koncentraci.

4.2 Cílená mutagenese

K přípravě DNA konstruktů byl využit kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Jako templát sloužil plazmid pCMV6-XL5 nesoucí gen kódující protein hTRPC5 přirozeného typu (OriGene Technologies). Primery pro konkrétní mutace byly navrženy pomocí internetového nástroje² *QuikChange Primer Design* (viz tabulka 1, kodon zaměněné aminokyseliny je podtržen) a byly nasyntetizovány společností Merck.

Tabulka 1 – Navržené primery pro příslušné mutace

Mutace	Primery (forward + reverse)
T970A	5'-ggggtgatggacaggaagaacaagttgcaactgcctcacgcg-3' 5'-cgcgtgaggcgagttgcaactgttcttctctgccatcacccc-3'
D652K/E653K	5'-gcaaggtgccacctttcttaaagtaactcatccagagcttcgtcc-3' 5'-ggacgaagctctggatgagttactttaagaaaggtggcaccttgc-3'
E418A	5'-atcccacatttccttaatcgcaccccaaatgaaacctag-3' 5'-ctaggtttcatttgggggtgcgattaaggaaatgtgggat-3'
D439A	5'-gggagttcattgcaaaagccatcaggttccaccag-3' 5'-ctggtggaacctgatggcttttgaatgaactccc-3'

DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR, z angl. polymerase chain reaction) v Thermo-cycleru (Eppendorf). Reakční směsi pro PCR byly připraveny smícháním komponent dostupných v kitu: 36,5 µl destilované H₂O; 5 µl reakčního pufru (10× reaction buffer); 3 µl Quick solution; 1 µl směsi dNTP (10µM); 1 µl templátové DNA (100 ng); 1,25 µl „forward“ a 1,25 µl „reverse“ primeru (oba 25µM) a 1 µl DNA polymerázy (PfuUltra; 2,5 U/µl). PCR byla provedena podle teplotního schématu znázorněného v tabulce 2 (str. 32). Po skončení PCR byl přidán 1 µl endonukleázy DpnI a celá směs byla inkubována při 37 °C po dobu 1 h.

² <https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>

Tabulka 2 – Schéma jednotlivých kroků PCR

Krok	Teplota (°C)	Doba trvání	Počet opakování
1.	95	60 s	1
2.	95	50 s	25x
3.	49	50 s	25x
4.	68	16 min	25x
5.	68	10 min	25x
6.	4	∞	-

K ověření přítomnosti PCR produktu byla využita horizontální elektroforéza. Agarózový gel byl připraven smícháním 30 ml destilované vody; 0,3 g agarózy; 600 µl 50× koncentrovaného TAE pufru a 1,5 µl peqGREEN. Připravený gel byl po ztuhnutí umístěn do elektroforetické vany naplněné 1× TAE puftrem. Do každé jamky gelu byla nanesena směs 5 µl PCR produktu s 2 µl nanášecího pufru. Elektroforetická vana byla poté na 45 min zapojena do okruhu pod napětím 80 V.

Po skončení elektroforézy byl gel zkontrolován v temné místnosti pod UV lampou a v případě potvrzení přítomnosti plazmidu o určité velikosti byl PCR produkt použit k amplifikaci plazmidů v ultrakompetentních XL10-Gold buňkách *E. coli* (Agilent Technologies). DNA byla do buněk vpravena metodou teplotního šoku podle protokolu použitého kitu (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit). Nejprve byly připraveny agarové plotny nalitím vysterilizované směsi (10 g Nutrient Agar No. 2, 250 ml destilované vody a 500 µl ampicilinu) na kultivační misky. Metoda teplotního šoku se prováděla na ledu, kde byly k 30 µl suspenze buněk *E. coli* přidány 2 µl β-merkaptoethanolu a celá směs byla za občasného míchání inkubována (10 min). Dále byly přidány 2 µl PCR produktu a buňky byly inkubovány na ledu (30 min). V dalším kroku byly mikrozkušavky se směsí umístěny do vodní lázně s teplotou 42 °C (45 s) a poté ihned vráceny zpátky na led (2 min). Do mikrozkušavek bylo poté přidáno 200 µl předeřátého (42 °C) LB média a celá směs byla umístěna do rotačního inkubátoru (1 h, 37 °C, 225–250 RPM, Shaking Incubator NB-205, N-Biotek). Po inkubaci byl objem mikrozkušavky rozetřen na agarovou plotnu, a ta byla poté umístěna do inkubátoru (16 h, 37 °C, 5% CO₂) v zavěšené poloze.

Po proběhlé inkubaci bylo z ploten sterilně odebráno několik oddělených kolonií, které byly následně inkubovány ve zkumavkách s 6 ml LB média s ampicilinem (finální koncentrace 100 mg/l) na rotačním inkubátoru (16 h, 37 °C, 230 RPM). Zkušavky byly poté centrifugovány (7 min, 4 °C, 6000 × g, Centrifuga Rotanta 460R, Hettich Instruments)

a ze vzniklé pelety byla izolována DNA s použitím kitu High Speed Plasmid Mini Kit, Geneaid (Biotech). Centrifugace v níže zmíněných krocích byla prováděna při pokojové teplotě a při otáčkách $13000 \times g$. Izolace DNA byla provedena podle přiloženého protokolu zahrnujícího kroky:

1. k peletě přidat 200 μ l PD1 pufru, objem resuspendovat, přenést do mikrozkušavky
2. přidat 200 μ l PD2 pufru, zkumavku otočit $10\times$ dnem nahoru, čekat 2 minuty
3. přidat 300 μ l PD3 pufru, zkumavku otočit $10\times$ dnem nahoru, centrifugovat (3 min)
4. přenést supernatant do 2ml zkumavky s mikrokolonou, centrifugovat (30 s)
5. přidat 400 μ l W1 pufru, centrifugovat (30 s)
6. přidat 600 μ l Wash pufru, centrifugovat (30 s)
7. vylít obsah zkumavky, centrifugovat (3 min)
8. umístit mikrokolonu nad čistou zkumavku, na střed filtru aplikovat 50 μ l elučního pufru, čekat 2 min, centrifugovat (2 min)

Vyizolovaná DNA byla následně testována spektrofotometrem (NanoDrop One, Thermo Scientific) při vlnové délce 260 nm pro určení výsledné koncentrace DNA. Pro ověření zavedení mutace byl produkt izolace odeslán na sekvenaci společnosti Eurofins Genomics. Výsledky sekvenace byly zkontrolovány v programu BioEdit verze 7.2.5.

4.3 Transfekce HEK293T buněk

Měření aktivity TRPC5 byla prováděna na lidských embryonálních ledvinných buňkách linie 293T (HEK293T, z angl. human embryonic kidney cells, ATCC). Buňky byly přechodně kotransfekovány 300 ng plazmidu kódujícího hTRPC5 přirozeného typu nebo jeho mutantní konstrukty (vektor pCMV6-XL5, OriGene Technologies) a 200 ng plazmidu kódujícího zelený fluorescenční protein GFP (vektor pQBI 25, TaKaRa) magnetem asistovanou transfekcí (MATra, z angl. magnet-assisted transfection, IBA). V některých experimentech byly HEK293T buňky kotransfekovány ještě s 300 ng plazmidu kódujícího lidský STIM1 (vektor pCMV6-XL5, OriGene Technologies) a v případě pokusů s karcholem byly buňky kotransfekovány s 200 ng plazmidu kódujícího lidský muskarinový receptor M_3 (vektor pcDNA3.1, Missouri S&T cDNA Resource Center). Pro účely měření změn intracelulárních koncentrací Ca^{2+} byly buňky kotransfekovány 200 ng plazmidu kódujícího fluorescenční protein mCherry (vektor pcDNA3.1, Addgene) místo GFP. Buňky byly 1–3 dny před transfekcí umístěny na 24-jamkové kultivační misky s 0,5 ml 5% fetálního telecího séra (FTS, PAN Biotech) v Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) v takové koncentraci,

aby v den transfekce byly konfluentní ze 60–80 %. Transfekční směs obsahovala 50 μ l Opti-MEM, příslušné množství DNA a reakčního činidla MATra (0,1 μ l MATra na každých 100 ng DNA). Po přidání transfekční směsi byly buňky umístěny na magnetickou destičku v inkubátoru (30 min, 37 °C, 5% CO₂). V dalším kroku bylo odstraněno médium a buňky byly pasážovány s použitím fosfátového pufru (PBS) a Versenova roztoku s trypsinem. Následně byl přidán 1 ml 5% FTS a 1–3 kapky této suspenze byly přeneseny na misku se sklíčkem pokrytým poly-L-lysinem a objem byl nakonec doplněn 2 ml 5% FTS v Opti-MEM. Takto připravené buňky byly umístěny do inkubátoru na 48–72 h před začátkem experimentu. K měření byly vybírány samostatné buňky značené GFP nebo mCherry.

4.4 Elektrofyziologická měření

Elektrofyziologická měření byla prováděna metodou terčíkového zámku (z angl. patch-clamp) umožňující snímání proudových odpovědí buněk exprimujících příslušný iontový kanál při nastaveném membránovém potenciálu. K záznamu proudových odpovědí sloužil zesilovač Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc; Molecular Devices) a analogově-digitální převodník Axon Digidata 1550B (Axon Instruments, Inc.; Molecular Devices) převádějící snímaná data do počítače. Proudové odpovědi byly snímány pomocí softwaru pCLAMP 10 zahrnujícího modul Clampex 10, který je určený také pro generování membránového potenciálu. Snímány byly odpovědi buď z celých buněk (tzv. whole-cell konfigurace), nebo byly v tzv. cell-attached konfiguraci měřeny proudové odpovědi jednotlivých kanálů.

Buňky narostlé na sklíčku byly umístěny do misky s roztokem ECS1/2, kam byla ponořena referentní elektroda. Na buňky byly aplikovány roztoky (kontrolní ECS1/2, případně směsi agonistů) pomocí gravitačního aplikačního systému sestávajícího ze sedmi nádobek pro roztoky napojených na teflonové hadičky, které vedou do úzkého svazku kapilár ústícího do jedné aplikační kapiláry. Kolem horní části kapiláry je umístěn výměník tepla řízený Peltierovým článkem a spodní část kapiláry je obmotána měděným drátkem, prostřednictvím kterých může být napětími příkazy řízena teplota aplikovaných roztoků pomocí digitálního převodníku Axon Digidata 1550B (Dittert et al., 2006). V našich experimentech se teplota aplikovaných roztoků pohybovala v rozmezí 25–5 °C a ústí kapiláry bylo umístěno přibližně 100 μ m od vybrané buňky.

Měřicí argentchloridová elektroda byla vložena do skleněné mikropipety vyrobené z trubiček z borosilikátového skla (typ GB150F-8P, Science Products) na horizontálním tahači P-1000 (Sutter Instrument). Hroty vyrobených mikropipet byly otaveny pomocí „polišovače“ Microforge MF-830 (Narishige), aby se jejich výsledný odpor pohyboval mezi 3–20 MΩ. Během experimentu byla měřicí elektroda ve skleněné mikropipetě umístěna do těsné blízkosti buňky pomocí mikromanipulátoru MP-225 (Sutter Instrument) a následnou aplikací podtlaku bylo dosaženo buď cell-attached konfigurace, případně bylo protržením membrány dosaženo whole-cell konfigurace. V experimentech bylo na buňky aplikováno napětí podle nastavených protokolů. Při snímání proudů z celých buněk byl využit lineárně se zvyšující napěťový protokol (z angl. ramp protocol) spočívající v aplikaci napětí, které se postupně zvyšuje z –100 mV na +100 mV s rychlostí 1V/s. To se opakovalo každé 3 vteřiny a mezi těmito pulzy byl membránový potenciál udržován na 0 mV. Aktivita jednotlivých kanálů byla měřena tzv. gap-free protokolem, kdy byl pipetový potenciál udržován na +120 mV.

4.5 Měření změn koncentrací intracelulárního Ca²⁺

K měření změn intracelulárních hladin Ca²⁺ (z angl. calcium imaging) byl využit systém Cell[^]R (Olympus). 1 h před zahájením měření byly HEK293T buňky exprimující hTRPC5 a fluorescenční protein mCherry inkubovány ve tmě při pokojové teplotě v ECS1 roztoku s 1M fura-2 AM (Invitrogen). Bezprostředně před měřením byly buňky opláchnuty ECS1 a během celého experimentu byly na buňky aplikovány roztoky výše zmíněným aplikačním systémem (viz kapitola 4.4). Fluorescenční sonda fura-2 AM po vstupu do buňky podstupuje hydrolytické štěpení, a vzniká tak její aktivovaná forma s vazebnými místy pro Ca²⁺. Excitační spektrum sondy fura-2 AM bez navázaných vápenatých kationtů je 380 nm a po jejich následném navázání se posouvá na 340 nm. V průběhu experimentu je tedy možné u obarvených buněk měřit změny fluorescence vyvolané jednotlivými vlnovými délkami v závislosti na koncentracích volného Ca²⁺.

4.6 Molekulární modelování

Algoritmy, které se uplatňují v molekulárně-dynamických (MD) simulacích jsou podrobněji popsány v článku (Phillips et al., 2005). Stručně, pohyby jednotlivých atomů během simulace je možné popsat Newtonovou pohybovou rovnicí (1):

$$m_i \ddot{\vec{r}}_i = - \frac{d}{d\vec{r}_i} U_{total}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N); \quad i = 1, 2 \dots N, \quad (1)$$

kde m_i je hmotnost atomu i a \vec{r}_i značí jeho polohu. U_{total} je celková potenciální energie simulovaného systému, která závisí na polohách všech atomů a je určena na základě parametrů silového pole. U_{total} je možné rozdělit na několik složek:

$$U_{total} = U_{vazba} + U_{úhel} + U_{dihedral} + U_{vdW} + U_{Coulomb}. \quad (2)$$

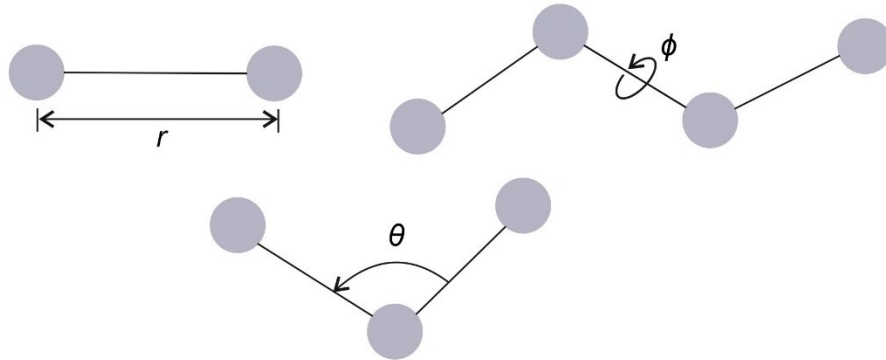
První tři (U_{vazba} , $U_{úhel}$, $U_{dihedral}$) popisují vazebné interakce a zahrnují změny energie vzniklé při deformaci kovalentních vazeb (U_{vazba}), úhlů mezi vazbami ($U_{úhel}$) a dihedrálních (torzních) úhlů ($U_{dihedral}$). Jednotlivé příspěvky jsou charakterizovány následujícími rovnicemi (3–5):

$$U_{vazba} = \sum_{vazby\ i} k_i^{vazba} (r_i - r_{0i})^2, \quad (3)$$

$$U_{úhel} = \sum_{úhly\ i} k_i^{úhel} (\theta_i - \theta_{0i})^2, \quad (4)$$

$$U_{dihedral} = \sum_{dihedral\ i} \begin{cases} k_i^{dihedral} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)], & n_i \neq 0 \\ k_i^{dihedral} (\phi_i - \gamma_i)^2 & n_i = 0 \end{cases}, \quad (5)$$

kde k_i představují silové konstanty (pro i -tou vazbu o délce r_i , obdobně pak pro i -tý úhel θ_i a i -tý torzní úhel ϕ_i). r_{0i} , θ_{0i} a ϕ_{0i} značí příslušné rovnovážné hodnoty. Pro přehlednost jsou parametry vazeb znázorněny na Obr. 9.



Obr. 9 – Parametry vazeb. r – délka vazby, θ – úhel vazby, ϕ – torzní úhel. Upraveno podle (Phillips et al., 2005).

Zbývající dvě složky definují nevazebné interakce. Zahrnují van der Waalsovy síly (U_{vdW}), které jsou aproximovány Lennardovým-Jonesovým (LJ) potenciálem (6):

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} 4 \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (6)$$

kde ε_{ij} je hloubka potenciálové jámy, r_{ij} je vzdálenost mezi dvěma atomy i a j a σ_{ij} představuje vzdálenost těchto atomů při nulovém LJ potenciálu. Druhá ne vazebná složka zahrnuje elektrostatické interakce ($U_{Coulomb}$) popsané Coulombovým zákonem (7):

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}}, \quad (7)$$

kde q_i, q_j jsou náboje částic i, j a ε_0 je permitivita vakua.

MD simulace byly provedeny na procesorech a výpočetních grafických kartách v superpočítačovém MetaCentru³ s využitím softwarového balíku NAMD (verze 2.12), který umožňuje realizovat tento typ výpočtů pro velké struktury proteinů ukotvených v membráně a obklopených vodní obálkou. K řešení pohybových rovnic používá NAMD Verletův algoritmus vhodný pro výpočet trajektorií systémů s velkým počtem molekul. Tento algoritmus využívá známé souřadnice a rychlosti atomů v čase t k výpočtu souřadnic a rychlostí v čase větším o Δt . Při MD simulacích biomolekul je nutné kontrolovat teplotu a tlak, které se mohou především na začátku výrazně měnit. Simulace se proto provádí v NPT souboru, kdy je udržováno konstantní látkové množství, tlak a teplota pomocí tzv. termostatu a barostatu.

4. 6. 1 Hledání vazebného místa pro LPC 18:1

Struktura lidského TRPC5 byla získána s využitím zveřejněné struktury zkrácené podjednotky hTRPC5 (UniProt ID: Q9UL62) vytvořené díky umělé inteligenci AlphaFold⁴, která je schopná predikovat struktury některých doposud nerozlišených oblastí. Následně byla v programu VMD 1.9.3 pomocí pluginu *Molefacture* vytvořena molekula LPC 18:1. Parametry silového pole pro LPC 18:1 byly získány pomocí serveru CGenFF⁵ a molekula byla umístěna do vytipované oblasti mezi helixy S2 a S3. Celá hybridní struktura byla ve VMD vložena do vodní obálky a následně ionizována 0,5M NaCl pomocí pluginů *Solvate* a *Auto-ionize*. Nejdříve byla spuštěna ekvilibrační simulace a souřadnice atomů v posledním snímku byly použity jako vstupní hodnoty navazujících kroků. Celá struktura byla následně vložena do fosfolipidové dvojvrstvy tvořené molekulami 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholinu (POPC) a poté opět solvatována a ionizována. Následně byly provedeny navazující ekvilibrační simulace podle kapitoly 3 veřejně přístupného protokolu

³ <https://metavo.metacentrum.cz>

⁴ <https://alphafold.ebi.ac.uk>

⁵ <https://cgenff.umaryland.edu>

Membrane Proteins Tutorial (Advanced)⁶ a nakonec byly spuštěny simulace při 37, 25 a 5 °C. Vznikly trajektorie od délce 12,5 ns (37 °C) a 9 ns (25 a 5 °C).

4. 6. 2 Akutní účinek oxaliplatin

K prozkoumání možného přímého vlivu oxaliplatin na receptor byla využita struktura hTRPC5 vytvořená pro předchozí simulaci. Molekula cyklohexan-1*R*,2*R*-diamin platiny (DACH-platiny) – produktu štěpení oxaliplatin, byla získána z krystalové struktury pankreatické ribonukleázy s adukty vzniklými při reakci s oxaliplatinou (PDB: 4S18). Parametry silového pole pro DACH-platinu byly získány pomocí serveru CGenFF a následně byla molekula umístěna do pórové oblasti TRPC5 receptoru k vytipovanému reziduu D633. Umístění celé struktury do membrány, solvatace, ionizace a další kroky molekulární dynamiky byly provedeny podle výše popsaného postupu (viz kapitola 4.6.1). Ze simulace spuštěné při 25 °C vznikla trajektorie o délce 8,5 ns. Mapa elektrostatického potenciálu byla vytvořena ve VMD pomocí pluginu *PME Electrostatics*.

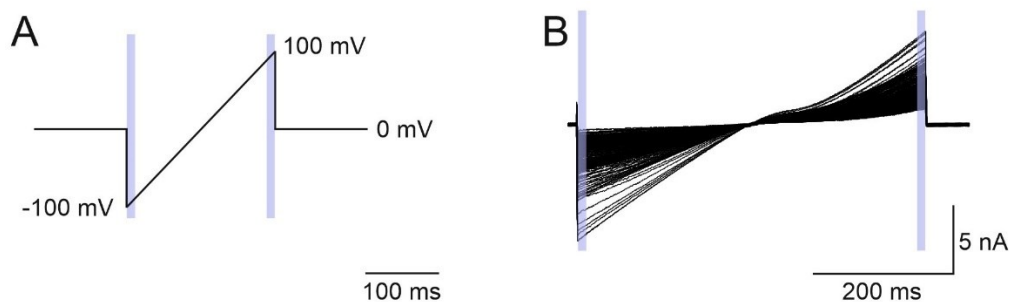
K vyhodnocení získaných trajektorií byly použity programy VMD 1.9.3, Chimera 1.14 a ChimeraX 1.3.

4. 7 Výpočty a statistika, vyhodnocení dat

Záznamy z elektrofyziologických a mikrofluorimetrických měření byly vyhodnoceny v programech Clampfit verze 10.4 a verze 11.2 a v programu CellR. K vyhodnocení trajektorií MD simulací byly využity programy VMD 1.9.3 a Chimera 1.14. Grafy byly vytvořeny pomocí programů SigmaPlot 10.0 a OriginPro 2021, ve kterých byla provedena i statistická analýza. Získaná data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM (standardní chyba průměru), (n = počet buněk), pokud není uvedeno jinak. K vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla využita jednosměrná analýza rozptylu (ANOVA) a Studentův t-test. Jako statisticky signifikantní byly považovány rozdíly s hladinou významnosti $P < 0,05$ (hladiny významnosti jsou značeny: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Časový průběh proudových odpovědí TRPC5 vyvolaných aplikací agonisty a lineárně se zvyšujícího napěťového protokolu (viz kap. 4.4) byl získán vnesením hodnot amplitud membránových proudů při -100 a při $+100$ mV (Obr. 10, str. 39).

⁶ <https://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials>



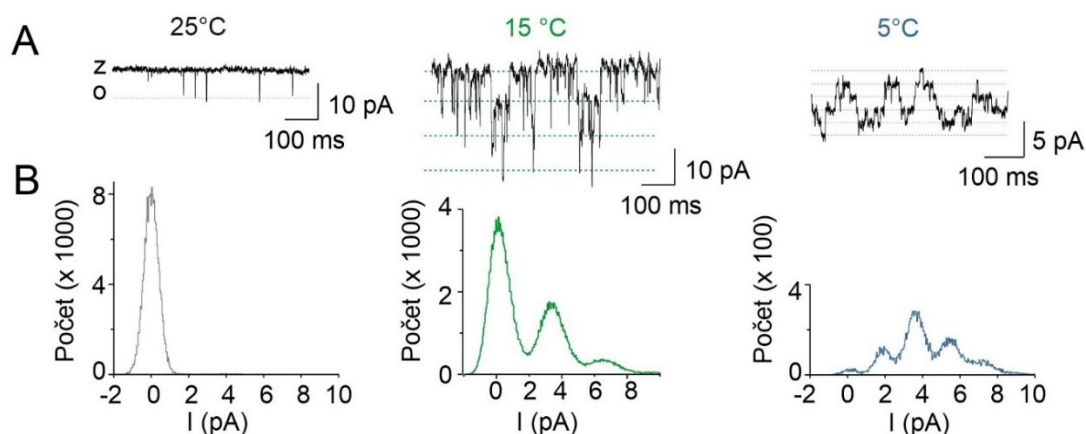
Obr. 10 – Ramp protokol. (A) Schéma napětového pulzu aplikovaného na buňky každé 3 vteřiny při snímání proudových odpovědí v tzv. whole-cell konfiguraci. Mezi každým pulzem, kdy se měnilo napětí z -100 na $+100$ mV, byl membránový potenciál držen na 0 mV. (B) Ukázkový záznam proudových odpovědí TRPC5 vyvolaných napětovými pulzy podle (A) a aplikací agonisty. Hodnoty amplitud membránových proudů byly získány v oblastech značených modrými obdélníky při -100 a $+100$ mV.

Teplotní koeficient Q_{10} byl pro teplotní závislost proudových odpovědí a pravděpodobnosti otevření (P_o) vypočítán podle vztahu (8):

$$Q_{10} = \left(\frac{X_2}{X_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}, \quad (8)$$

kde X_1 , X_2 jsou amplitudy proudových odpovědí, případně hodnoty pravděpodobnosti otevření (P_o) získané při teplotách T_1 a T_2 .

V případech, kdy byl v měřeném terčíku víc než jeden aktivní iontový kanál, bylo možné určit pravděpodobnost otevření (NP_o), kde N značí množství iontových kanálů na jednom terčíku. Pravděpodobnost otevření byla získána z all-point amplitudových histogramů fitovaných Gaussovskými funkcemi (Obr. 11).



Obr. 11 – All-point amplitudové histogramy. (A) Příklady záznamů proudových odpovědí při třech různých teplotách s několika otevřenými kanály současně. Počet hladin (počet kanálů otevřených současně) sloužil k výpočtu maximálního množství kanálů v jednom terčíku. (B) All-point amplitudové histogramy odpovídající záznamům v (A).

NP_o byla vypočítána z rovnice (9):

$$NP_o = \left(\frac{A_1 + 2A_2 + \dots + nA_n}{A_0 + A_1 + \dots + A_n} \right), \quad (9)$$

kde A_0 je plocha pod křivkou all-point amplitudového histogramu odpovídající hladině uzavřeného stavu kanálu. A_1, A_2, \dots, A_n jsou plochy pod křivkou 1., 2. až n -té hladiny, což odpovídá situaci, kdy byl otevřen 1, 2 až n iontových kanálů současně. Pro vyvolání maximální proudové odpovědi, a tím i určení počtu hladin, tedy množství iontových kanálů, byl na konci měření aplikován agonista. Pravděpodobnost otevření kanálu (P_o) byla poté vypočítána z NP_o vydělením zjištěným počtem iontových kanálů v jednom terčičku (N).

Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření byla fitována křivkou Boltzmannovy rovnice (10) ve tvaru:

$$P_o(T) = \frac{P_{25} + (P_{max} - P_{25})}{1 + e^{-\frac{(T-T_{1/2})}{dT}}}, \quad (10)$$

kde P_{25} je hodnota pravděpodobnosti otevření (P_o) při 25 °C a P_{max} udává maximální hodnotu P_o . T je teplota extracelulárního roztoku, kterým byly omývány buňky, a $T_{1/2}$ je teplota, při níž byla hodnota P_{max} poloviční. dT popisuje strmost závislosti charakterizující teplotní citlivost kanálu.

Termodynamická analýza procesu otevírání a zavírání iontového kanálu byla provedena s využitím van't Hoffovy rovnice (11):

$$\ln(K_{eq}) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (11)$$

kde ΔH je změna entalpie, ΔS je změna entropie, R je univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) a T udává termodynamickou teplotu. K_{eq} je rovnovážná konstanta odvozená z pravděpodobnosti otevření kanálu (P_o) (12):

$$K_{eq} = \frac{P_o}{(1 - P_o)} \quad (12)$$

Van't Hoffova křivka byla sestrojena vynesemím přirozeného logaritmu K_{eq} v závislosti na převrácené hodnotě termodynamické teploty $1/T$. Změny entalpie byly vypočítány ze směrnice přímky lineární regrese proložené nejstrmější oblastí van't Hoffovy křivky podle rovnice (13) a změny entropie byly vypočítány z průsečíku přímky podle rovnice (14):

$$\alpha = - \frac{\Delta H}{R}, \quad (13)$$

$$\beta = \frac{\Delta S}{R}, \quad (14)$$

kde α je směrnice přímky a β je průsečík přímky.

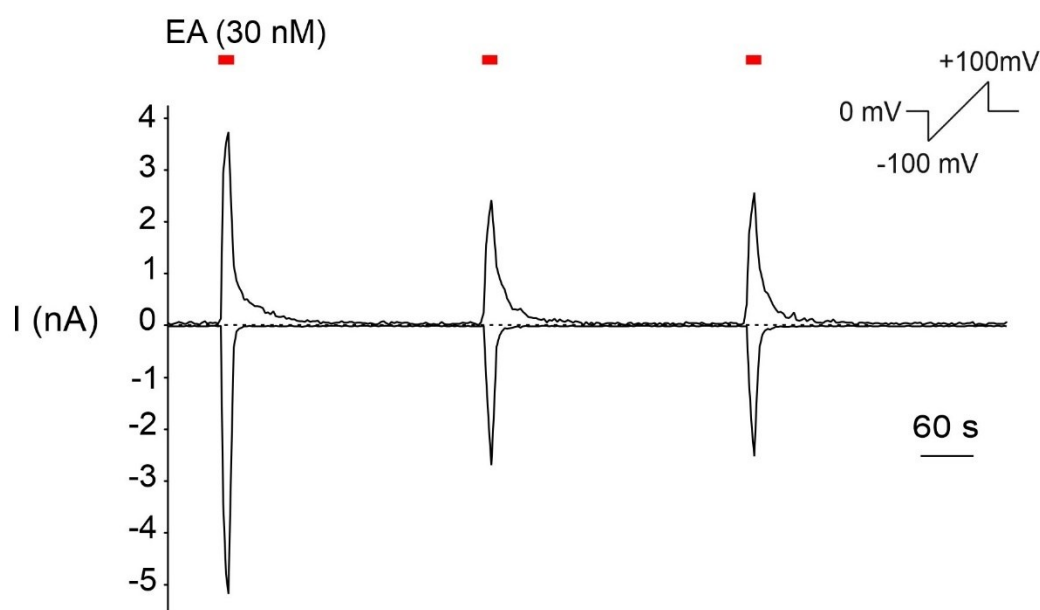
5 Výsledky

5.1 Chladem modulovaná aktivace TRPC5 iontového kanálu

V první sérii experimentů byly s využitím metody terčíkového zámku popsány parametry chladové aktivace lidského TRPC5 iontového kanálu přirozeného typu a jeho konstruktů. Membránové proudy byly měřeny z celých buněk i na úrovni jednotlivých kanálů. Experimenty byly prováděny v teplotním rozsahu od 25 °C do 5 °C.

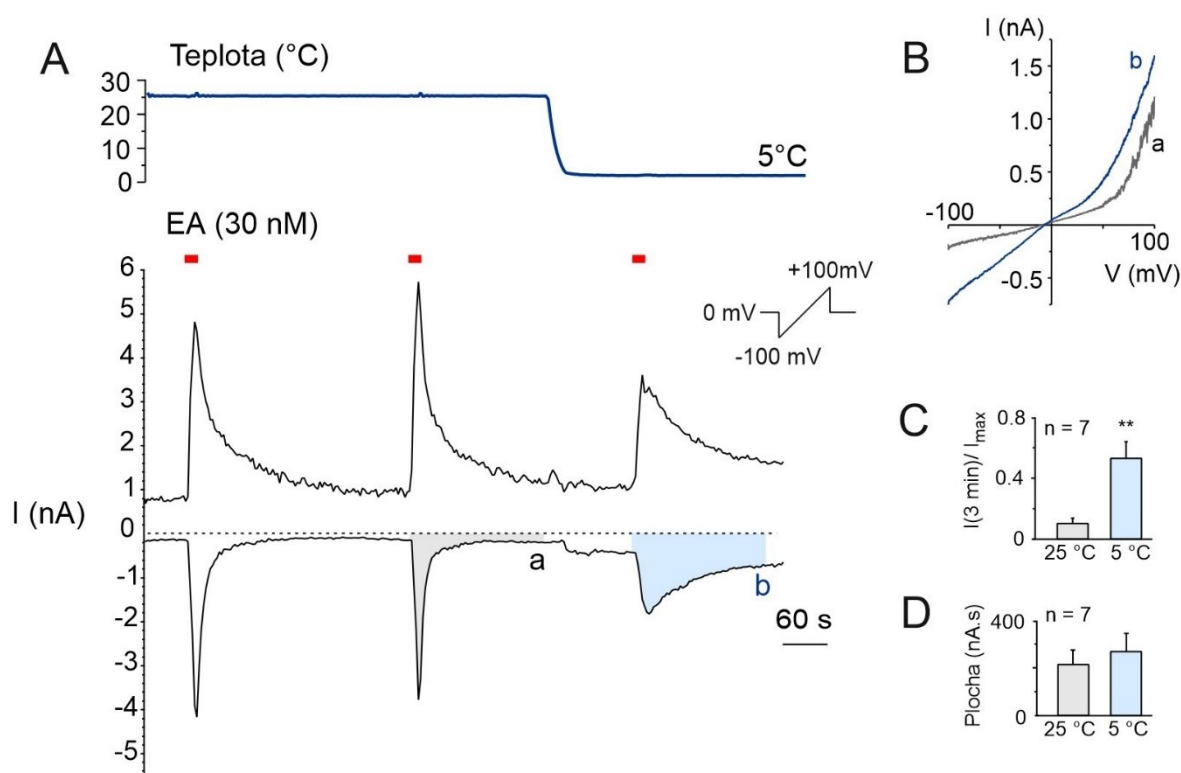
5.1.1 Chlad snižuje amplitudu proudové odpovědi a zpomaluje její deaktivaci

K popisu vlivu chladu na aktivaci TRPC5 při snímání proudů z celé buňky (whole-cell konfigurace) sloužil optimalizovaný protokol využívající ke stimulaci receptoru lineárně se zvyšující napětí (ramp protokol). Současně byl aplikován agonista TRPC5 – EA (30nM) po dobu 10 s každých 5 minut. Měření byla prováděna v kontrolním extracelulárním roztoku (ECS 1) a skleněná pipeta s měřicí mikroelektrodou obsahovala intracelulární roztok (ICS). Amplituda proudových odpovědí se s opakovanou aplikací EA u většiny buněk snižovala, pravděpodobně kvůli desenzitizaci kanálu (Obr. 12).



Obr. 12 – Chemická a napěťová stimulace WT TRPC5. Reprezentativní záznam proudových odpovědí na EA (30nM) při teplotě 25 °C. Červené symboly značí dobu 10s aplikace EA. Lineárně se zvyšující napěťový protokol aplikovaný každé 3 s je znázorněn vpravo nahoře.

Působením chladu se statisticky významně snížila amplituda proudových odpovědí na EA, a to především na záporných potenciálech (z $-5,65 \pm 1,36$ nA na $-2,27 \pm 0,54$ nA; $n = 7$; $P = 0,014$; Studentův t-test) (Obr. 13A). Proudově-napěťová závislost určená z hodnot proudových odpovědí ve třetí minutě od začátku aplikace agonisty při 25 °C a při 5 °C vykazovala v chladu nižší rektifikaci (Obr. 13B) nasvědčující vyšší přetrvávající aktivaci kanálů vlivem zpomalené deaktivace. Maximální amplituda odpovědi na záporném membránovém potenciálu (-100 mV) po 3 min od začátku aplikace EA byla při 5 °C přibližně 5× vyšší než na 25 °C, zatímco plocha pod křivkou proudové odpovědi (celkový přenesený náboj) se zvýšila v průměru téměř 1,3× (Obr. 13C, D).



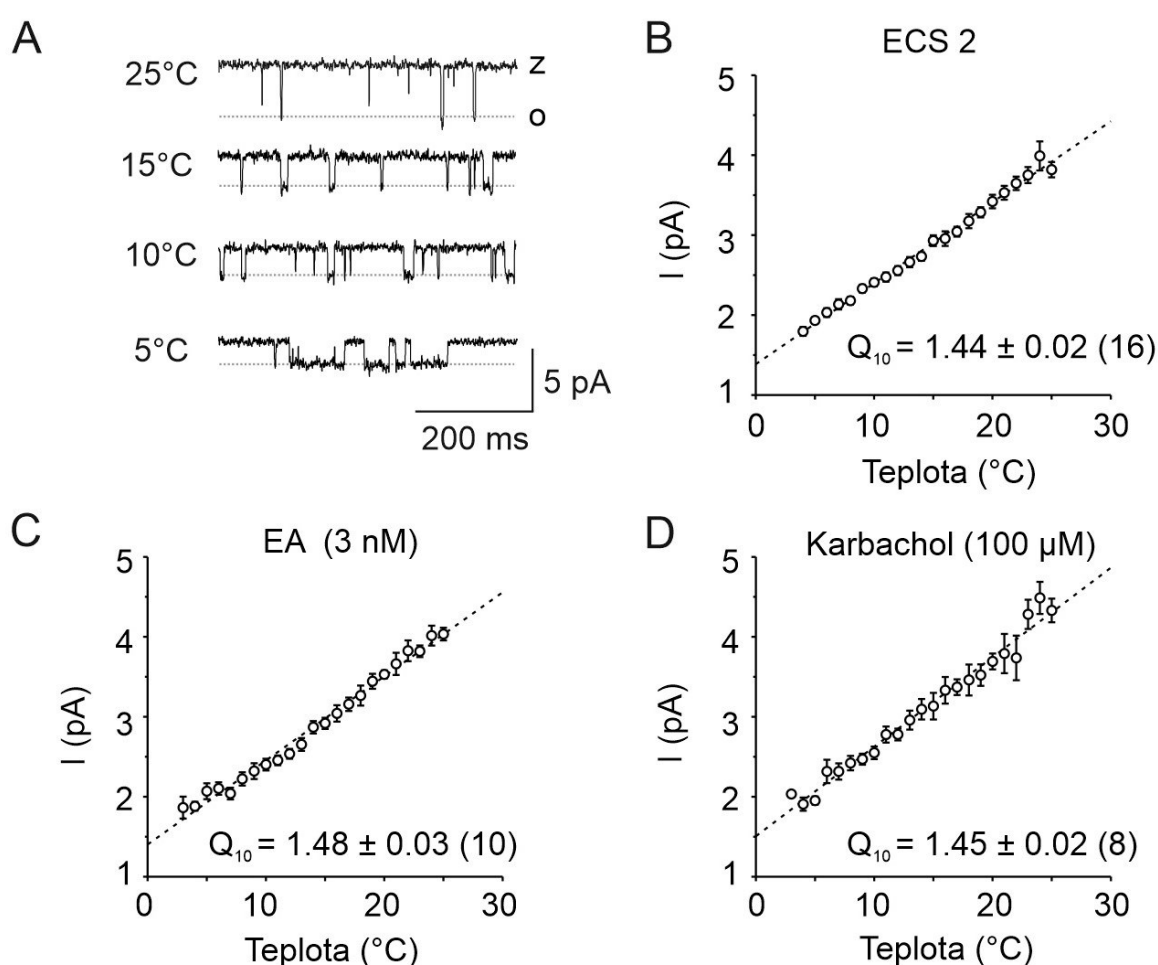
Obr. 13 – Modulace proudové odpovědi WT TRPC5 chladem. (A) Časový průběh změny teploty (nahore) a reprezentativní záznam proudových odpovědí na EA (30nM, dobu aplikace značí červené symboly) (dole). (B) Proudově-napěťová závislost odpovědi TRPC5 měřená ve 25 °C a v 5 °C v časech vyznačených písmeny a, b v (A). (C) Relativní pokles maximální proudové odpovědi po 3 min od začátku aplikace EA ve 25 °C (šedá) a v 5 °C (modrá). (D) Rozdíl ve velikosti plochy pod křivkou proudové odpovědi ve 25 °C (šedá) a v 5 °C (modrá). Hodnoty v (C, D) jsou uvedeny jako průměr ± SEM ($n = 7$).

5. 1. 2 Chlad snižuje amplitudu jednotkových proudových odpovědí

Vliv chladu na kinetiku TRPC5 byl zkoumán také na úrovni samostatných iontových kanálů v tzv. cell-attached konfiguraci s použitím gap-free protokolu. Pokusy byly prováděny

v kontrolním extracelulárním roztoku (ECS 2), nebo v přítomnosti aktivátorů TRPC5 – EA (3nM) a karcholu (100μM). Pipeta byla naplněna roztokem ECS 2 a pipetový potenciál byl udržován na +120 mV.

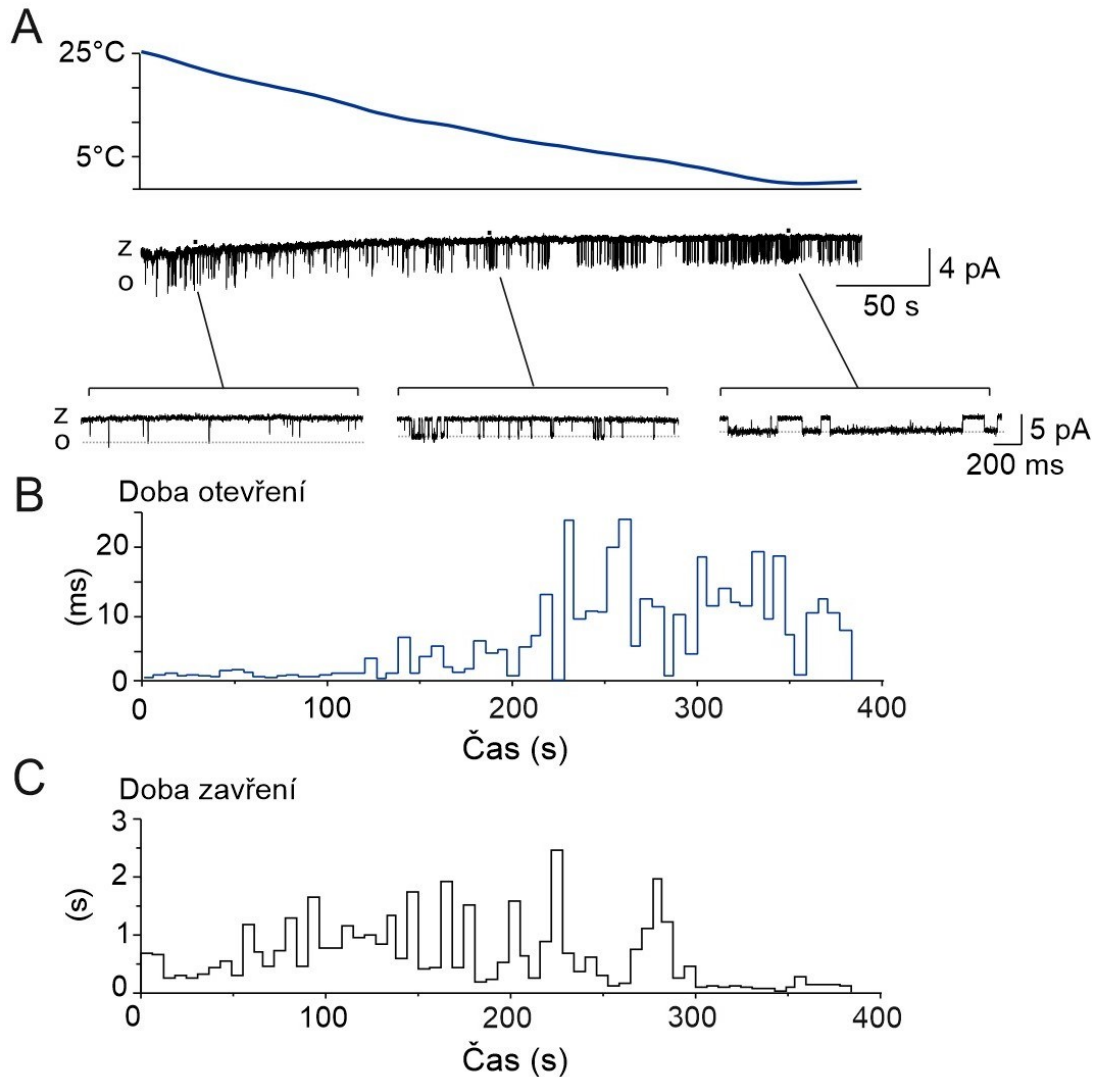
S teplotou postupně klesající z 25 °C na 5 °C se průměrná amplituda jednotkových proudů snižovala s hodnotou teplotního koeficientu $Q_{10} \sim 1,5$. Mezi experimenty v kontrolním ECS 2 (z $3,96 \pm 0,10$ pA na $1,960$ pA; $Q_{10} = 1,44 \pm 0,02$; $n = 16$), v přítomnosti EA (z $4,02 \pm 0,08$ pA na $1,99 \pm 0,10$ pA; $Q_{10} = 1,48 \pm 0,03$; $n = 10$) a v přítomnosti karcholu (z $4,35 \pm 0,15$ pA na $1,96 \pm 0,05$ pA; $Q_{10} = 1,45 \pm 0,02$; $n = 8$) nebyl statisticky významný rozdíl (jednocestná ANOVA; $P = 0,557$) (Obr. 14).



Obr. 14 – Teplotní závislost amplitud jednotkových proudů WT TRPC5. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí TRPC5 v různých teplotách s pipetovým potenciálem +120 mV měřených v cell-attached konfiguraci v kontrolním extracelulárním roztoku (ECS 2). „z“ značí hladinu zavření kanálu a „o“ značí hladinu otevření kanálu. (B-D) Teplotní závislost jednotkových proudů v ECS 2 (B), v přítomnosti EA (C) a karcholu (D). Hodnoty Q_{10} jsou průměr \pm SEM, počet buněk je uveden v závorce.

5. 1. 3 Chlad prodlužuje dobu otevření a zkracuje dobu zavření

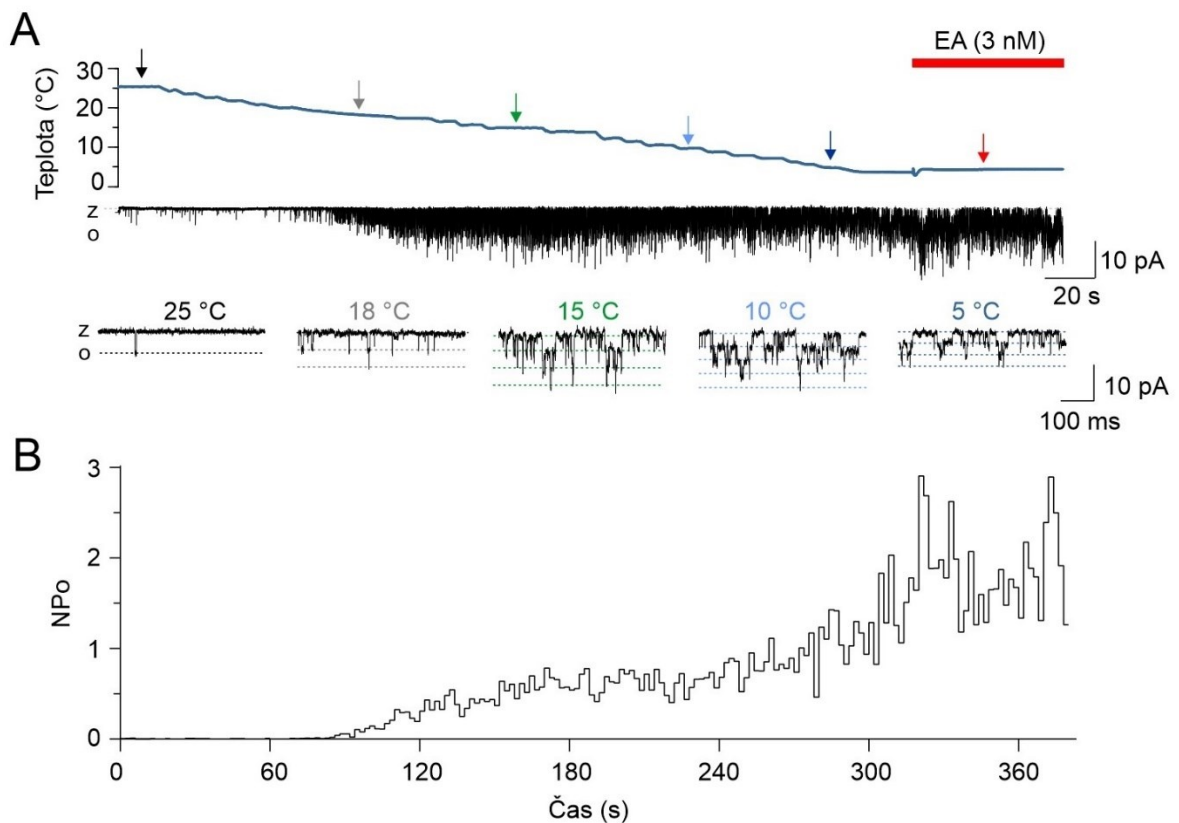
Analýza záznamu jednotkové aktivity v případě jednoho aktivního WT TRPC5 kanálu umožnila podrobnější popis kinetiky procesu otevírání a zavírání. Se snižováním teploty z 25 °C na 5 °C s rychlostí <1 °C/s se prodloužila průměrná doba otevření, zatímco průměrná doba zavření se zkrátila (Obr. 15).



Obr. 15 – Teplotní závislost doby otevření a zavření WT TRPC5. (A) Reprezentativní záznam proudových odpovědí se znázorněným průběhem snižování teploty (nahore). Zvětšené 2s úseky záznamu v různých teplotách (22 °C, 13 °C, 5 °C). „z“ značí hladinu zavření kanálu a „o“ značí hladinu otevření kanálu. (B,C) Časový průběh průměrné doby otevření (B) a průměrné doby zavření (C) měnící se v závislosti na teplotě. Průměrné hodnoty jsou získány ze 6 s dlouhých intervalů.

5. 1. 4 Pravděpodobnost otevření se zvyšuje s klesající teplotou

Ze záznamů s vyšším počtem aktivních kanálů nebylo možné stanovit kinetické parametry. Byla proto určena pravděpodobnost otevření (NP_o), kde N značí množství aktivních iontových kanálů na jednom terčíku. Pravděpodobnost otevření TRPC5 se s poklesem teploty z 25 °C na 5 °C postupně zvyšovala (Obr. 16).

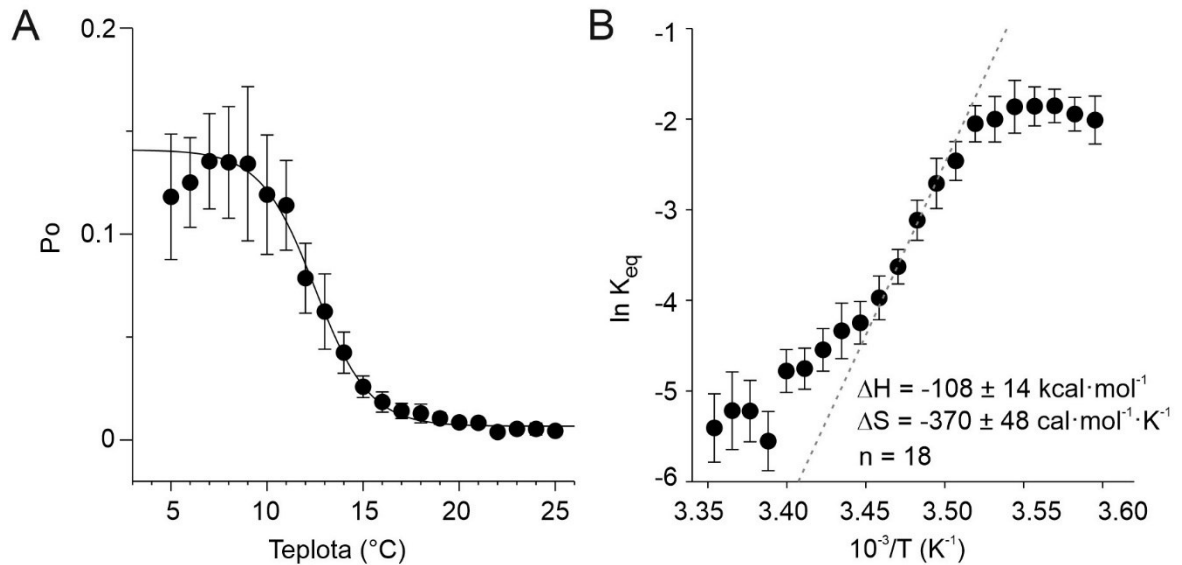


Obr. 16 – Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření WT TRPC5. (A) Reprezentativní záznam proudových odpovědí se znázorněným průběhem snižování teploty (nahore). Na konci měření byl aplikován EA (3nM). Zvětšené 500ms úseky záznamu v různých teplotách (dole), jak znázorňují barevné šipky. „z“ značí hladinu zavření kanálu a „o“ značí hladinu otevření kanálu. (B) Ukázkový časový průběh pravděpodobnosti otevření (NP_o) zvyšující se s klesající teplotou. N je počet aktivních kanálů v jednom terčíku.

5. 1. 5 WT TRPC5 je vysoce teplotně citlivý

Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření (P_o) WT TRPC5 má sigmoidní charakter s nejstrmějším sklonem v rozmezí teplot od $15,8 \pm 0,8$ °C do $11,3 \pm 0,7$ °C ($n = 18$). Okolo 8–5 °C bylo možné pozorovat saturaci aktivity kanálů (Obr. 17A, str. 47). Termodynamickou analýzou byly odhaleny výrazné změny entalpie (ΔH) a entropie (ΔS): $\Delta H = -108 \pm 14$ kcal·mol⁻¹; $\Delta S = -370 \pm 48$ cal·mol⁻¹·K⁻¹ (Obr. 17B, str. 47). Hodnota

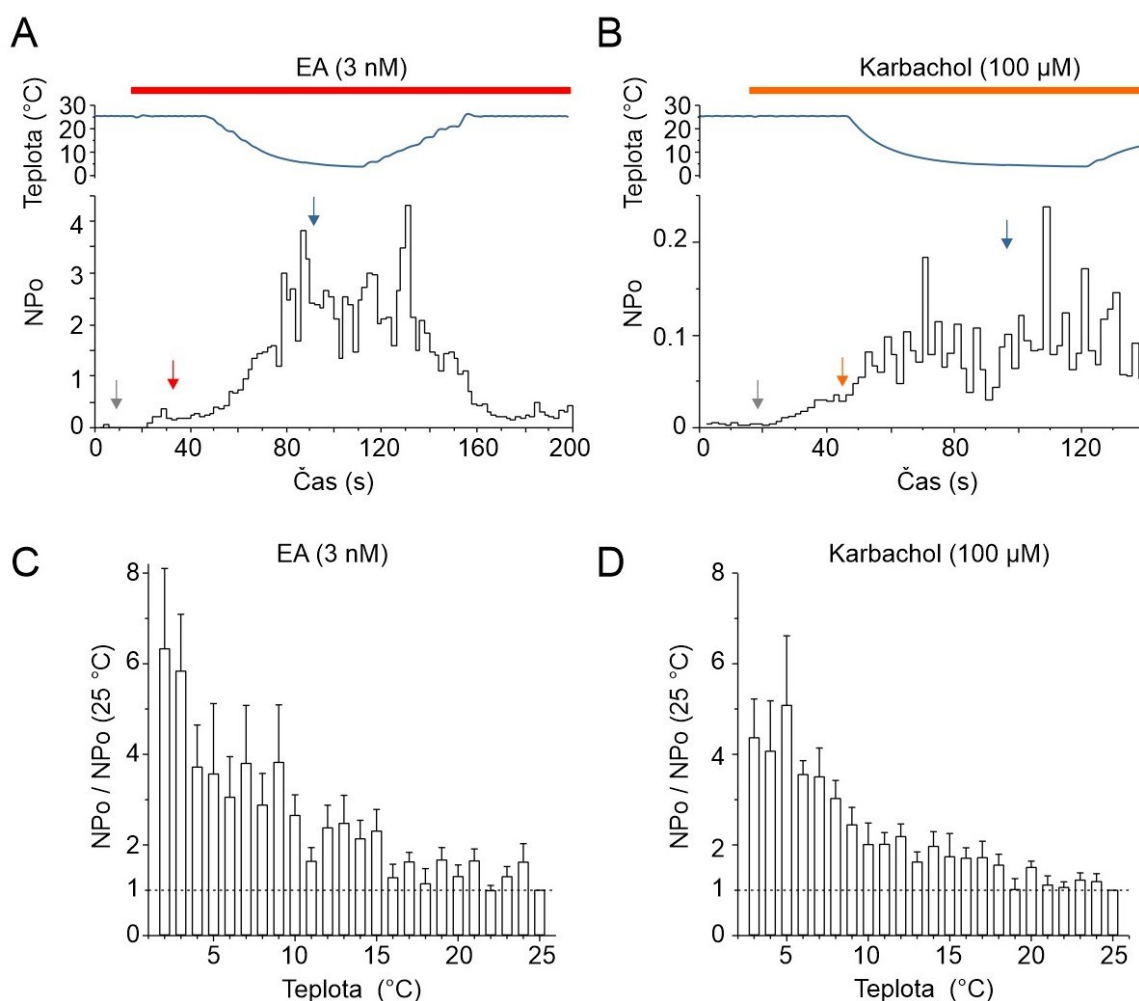
teplotního koeficientu procesu otevírání a zavírání iontového kanálu $Q_{10} = 0,04 \pm 0,01$ prokazuje silnou chladovou závislost TRPC5.



Obr. 17 – Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření WT TRPC5. (A) Vynesení závislosti průměrných hodnot pravděpodobnosti otevření (P_o) \pm SEM ($n = 18$) na teplotě. Data jsou proložena teoretickou Boltzmannovou funkcí ve tvaru: $P_o(T) = P_{25} + (P_{max} - P_{25}) / (1 + \exp((T - T_{1/2}) / dT))$, kde se $P_{25} = 0,007 \pm 0,001$, $P_{max} = 0,141 \pm 0,003$, $T_{1/2} = 12,50 \pm 0,01$ °C, $dT = 1,4 \pm 0,1$ °C). (B) Van't Hoffovo vynešení závislosti přirozeného logaritmu rovnovážné konstanty na převrácené hodnotě absolutní teploty. Přímka lineární regrese (přerušovaná čára) je proložena nejstrmějším úsekem v rozsahu $15,8 \pm 0,8$ °C do $11,3 \pm 0,7$ °C, odkud byly vypočítány změny entalpie a entropie a teplotní koeficient Q_{10} .

5. 1. 6 Chlad potencuje odpovědi na aktivátory TRPC5

Snížení teploty z 25 °C na 5 °C v přítomnosti aktivátorů TRPC5 – EA (3nM) a karcholu (100 μ M) zvýšilo relativní pravděpodobnost otevření ($NP_o(5^\circ\text{C})/NP_o(25^\circ\text{C})$) $3,6 \pm 1,6\times$ (EA, $n = 10$) a $5,1 \pm 1,5\times$ (karchol, $n = 10$) (Obr. 18A, B; str. 48), což odpovídá hodnotám teplotního koeficientu $Q_{10} = 0,53$ a $Q_{10} = 0,44$. Působení aktivátorů tedy vedlo ke snížení specifické chladové citlivosti iontového kanálu (Obr. 18C, D; str. 48).

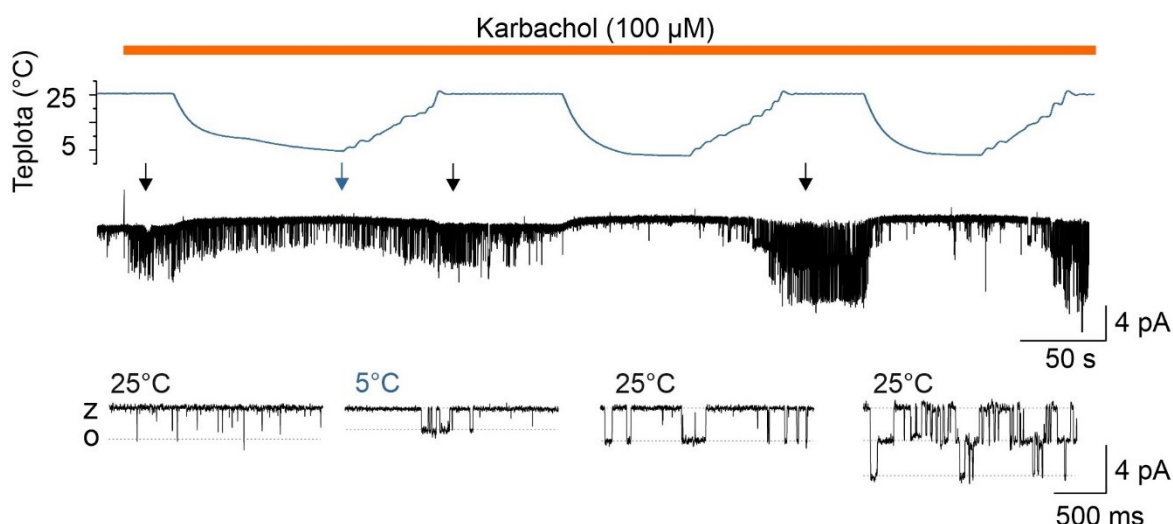


Obr. 18 – Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření WT TRPC5 v přítomnosti aktivátorů. (A, B) Časové průběhy pravděpodobnosti otevření (NP_o) (A) v přítomnosti EA (3nM) a (B) v přítomnosti karbacholu (100 μ M), průběh změn teplot je znázorněn nahoře. Průměrné hodnoty (NP_o) jsou získané z 2s po sobě jdoucích úseků ze záznamů proudových odpovědí. (C, D) Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření (průměrná NP_o normalizovaná na hodnotu NP_o naměřenou při 25 °C) (C) v přítomnosti EA (3nM, $n = 10$) a (D) v přítomnosti karbacholu (100 μ M, $n = 10$). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty \pm SEM.

5. 2 Vliv signalizačních drah na chladovou citlivost TRPC5

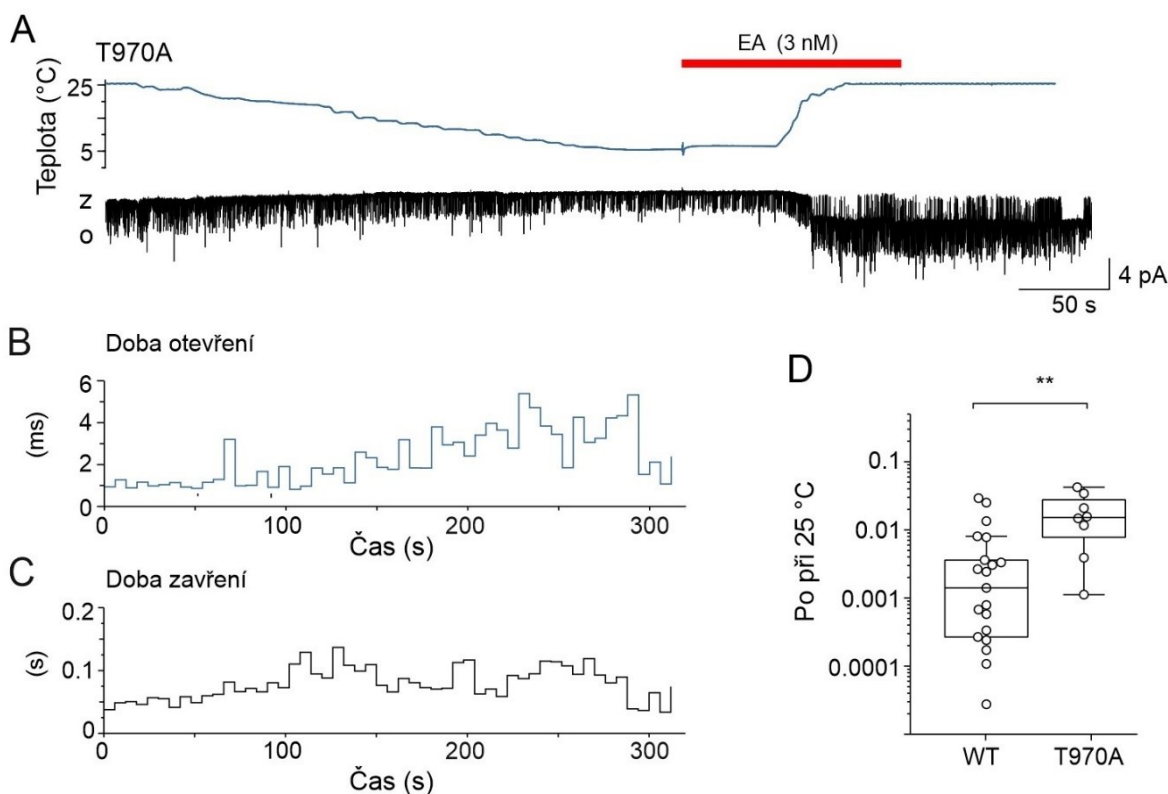
5. 2. 1 Zapojení fosforylačního místa T970 v chladové aktivaci TRPC5

Při opakované aplikaci chladu v trvalé přítomnosti karbacholu (100 μ M) jsme pozorovali postupné snížení pravděpodobnosti otevření v důsledku desenzitizace. Po následném zvýšení teploty na 25 °C aktivita kanálů výrazně vzrostla (Obr. 19, str. 49).



Obr. 19 – Desenzitizace proudové odpovědi WT TRPC5 opakovaným působením chladu. Reprezentativní záznam proudových odpovědí TRPC5 v přítomnosti karcholu ($100\mu\text{M}$). Časový průběh změn teploty (nahore) a zvětšené 2s úseky záznamu v různých teplotách, jak naznačují šipky (dole). „z“ značí hladinu zavření kanálu a „o“ značí hladinu otevření kanálu.

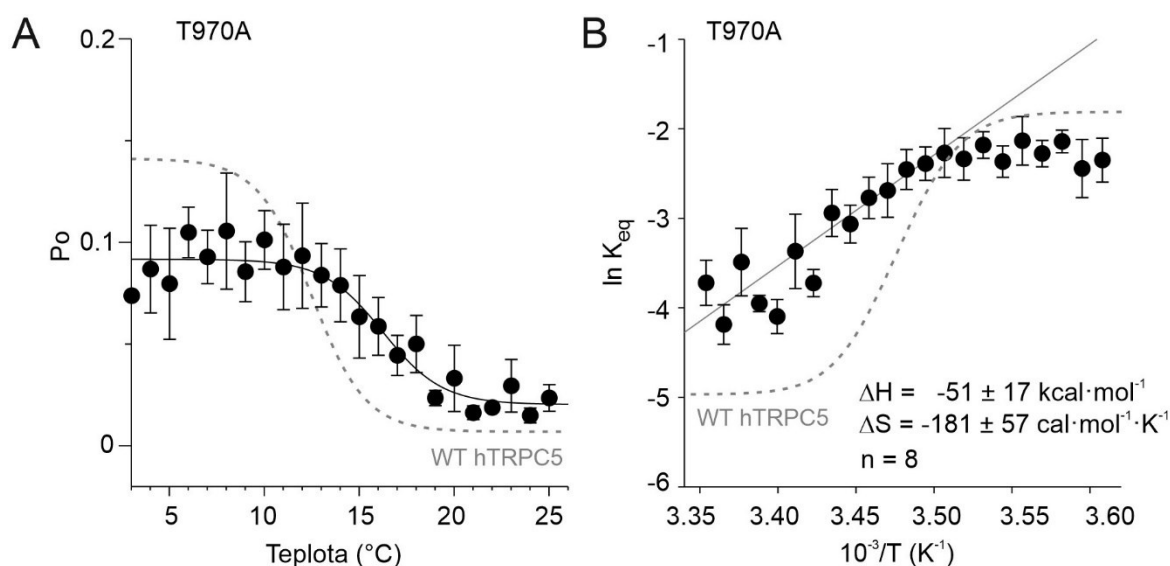
Karchol aktivuje TRPC5 prostřednictvím signalizační dráhy proteinů $G_{q/11}$ (viz kapitola 2.2.1.3). V procesu desenzitizace odpovědi na karchol má klíčovou úlohu threonin 970 jako fosforylační místo pro PKC. Abychom zjistili úlohu tohoto rezidua v chladové aktivaci TRPC5, zaměnili jsme fosforylační místo threonin 970 za alanin, čímž bylo zabráněno možné fosforylaci. Mutant T970A vykazoval statisticky významně vyšší bazální aktivitu při $25\text{ }^\circ\text{C}$ ($P_o = 0,018 \pm 0,005$; $n = 8$) oproti TRPC5 přirozeného typu ($P_o = 0,0047 \pm 0,0017$, $n = 22$) ($P = 0,008$; Studentův t-test). Průměrná doba otevření se s klesající teplotou prodlužovala (Obr. 20B, str. 50). Amplitudy jednotkových proudů a jejich teplotní závislost se u mutantního kanálu T970A TRPC5 ($3,72 \pm 0,08\text{ pA}$; při $25\text{ }^\circ\text{C}$; $n = 9$) statisticky významně nelišily od hodnot WT TRPC5 ($P = 0,429$; Studentův t-test) ($Q_{10} = 1,44 \pm 0,01$; $P = 0,829$; Studentův t-test).



Obr. 20 – Teplotní závislost délky otevření a zavření T970A TRPC5. (A) Reprezentativní záznam proudových odpovědí s časovým průběhem změny teploty (nahore). Během měření byl aplikován EA (3nM). „z“ značí hladinu zavření kanálu a „o“ značí hladinu otevření kanálu. (B, C) Časový průběh průměrných dob otevření (B) a zavření (C) měnicích se s klesající teplotou, jak je naznačeno v (A, nahore). Průměrné doby otevření a zavření jsou získány ze 6s intervalů záznamu jednoho terčíku se třemi aktivními iontovými kanály v (A). (D) Porovnání průměrných hodnot pravděpodobnosti otevření (P_o) WT ($n = 22$) a T970A ($n = 8$) TRPC5 při 25 °C (vyneseno na logaritmické stupnici). Krabicový graf znázorňuje rozložení dat mezi 25. a 75. percentilem a medián (vodorovné úsečky). Chybové úsečky označují hodnoty mezi 10. a 90. percentilem.

5. 2. 2 Termodynamická analýza chladové aktivace T970A TRPC5

Vynesení závislosti pravděpodobnosti otevření na teplotě odhalilo nižší chladovou citlivost T970A v porovnání s WT (Obr. 21A, str. 51). Hodnoty změn entalpie a entropie ($\Delta H = -51 \pm 17 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta S = -181 \pm 57 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) vypočítané z nejstřednější oblasti mezi $22,1 \pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$ a $13,1 \pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$ byly v porovnání s WT TRPC5 statisticky významně sniženy ($P = 0,009$; Studentův t-test $n = 8$) (Obr. 21B, str. 51). Hodnota teplotního koeficientu procesu otevírání a zavírání T970A byla oproti WT vyšší ($Q_{10} = 0,22 \pm 0,06$), odpovídající nižší teplotní závislosti.



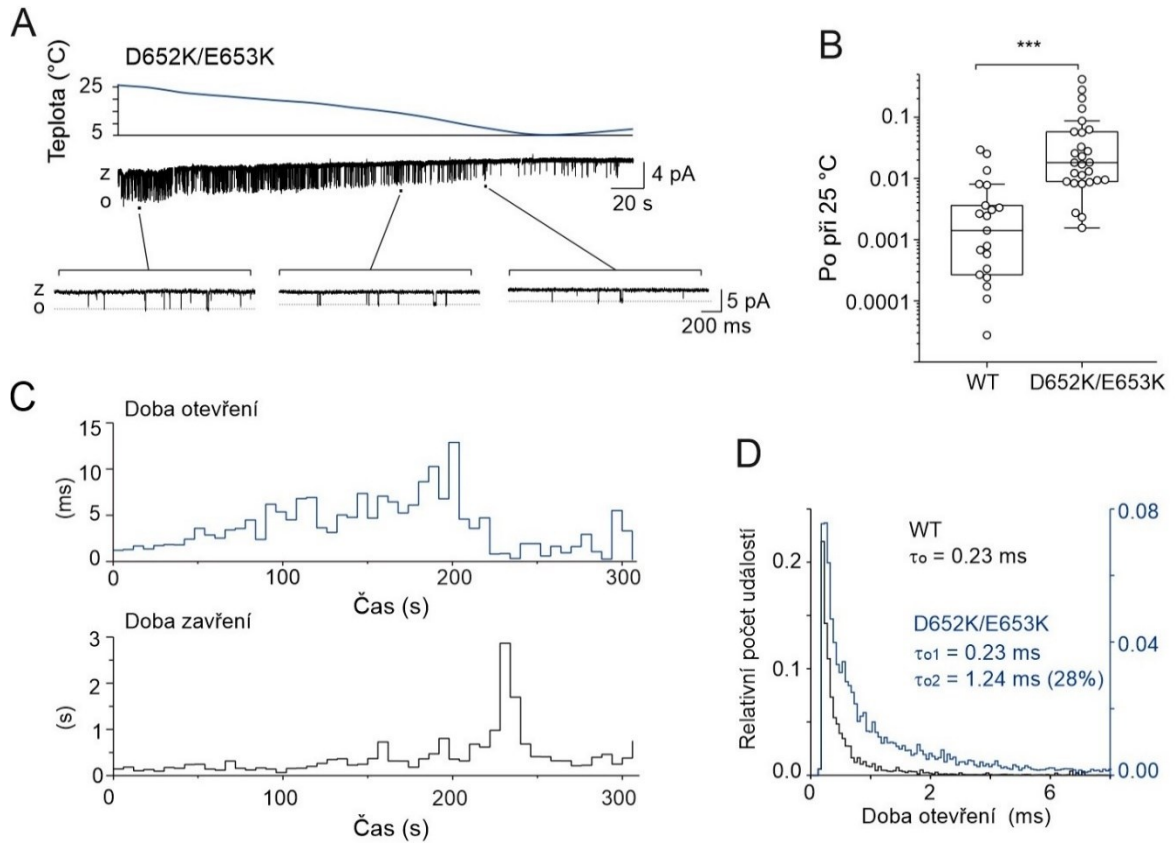
Obr. 21 – Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření T970A TRPC5. (A) Průměrné hodnoty pravděpodobnosti otevření (P_o) \pm SEM ($n = 8$) vynesené v závislosti na teplotě. (B) Van't Hoffův graf závislosti přirozeného logaritmu rovnovážné konstanty na převrácené hodnotě absolutní teploty. Přímka lineární regrese je proložena nejstrmějším úsekem a její sklon sloužil k výpočtu změn entalpie a entropie a teplotního koeficientu Q_{10} . Přerušovaná čára naznačuje teplotní závislost pro WT TRPC5.

5. 2. 3 Chladová citlivost TRPC5 závisí na interakci s endogenním STIM1

Protein STIM1 může přímou interakcí aktivovat TRPC5 kanál v důsledku vyčerpání vnitřních zásob Ca^{2+} , přičemž aktivita STIM1 je teplotně regulována nezávisle na hladinách Ca^{2+} (viz kapitola 2.2.1.2). Ve snaze prozkoumat možnou úlohu STIM1 v chladové aktivaci TRPC5 byla mutována dvě rezidua (D652 a E653) důležitá pro funkční interakci těchto proteinů. Výměnou obou záporně nabitých reziduí za lysiny se naruší funkční interakce STIM1 a TRPC5, zatímco fyzická interakce obou proteinů narušena není (Lee et al., 2010).

Amplituda jednotkových proudů D652K/E653K TRPC5 ($3,79 \pm 0,07$ pA; 25°C ; $n = 25$) a jejich teplotní závislost ($Q_{10} = 1,43 \pm 0,03$) se statisticky významně nelišily od kanálu přirozeného typu ($P = 0,829$ a $P = 0,833$; Studentův t-test). Při 25°C vykazoval dvojmutant D652K/E653K statisticky významně vyšší bazální aktivitu ($P_o = 0,058 \pm 0,019$; $n = 27$) oproti kanálu přirozeného typu ($P = 0,014$; Studentův t-test) (Obr. 22B, str. 52). Kinetická analýza záznamu jednotkových proudů z terčíku, na kterém byl přítomen jen jeden aktivní kanál, odhalila vliv ochlazení na prodloužení průměrné doby otevření, nicméně s poklesem teploty pod 10°C se doba otevření začala zkracovat (Obr. 22C, str. 52). Zatímco histogram doby otevření na 25°C bylo možné pro WT aproximovat

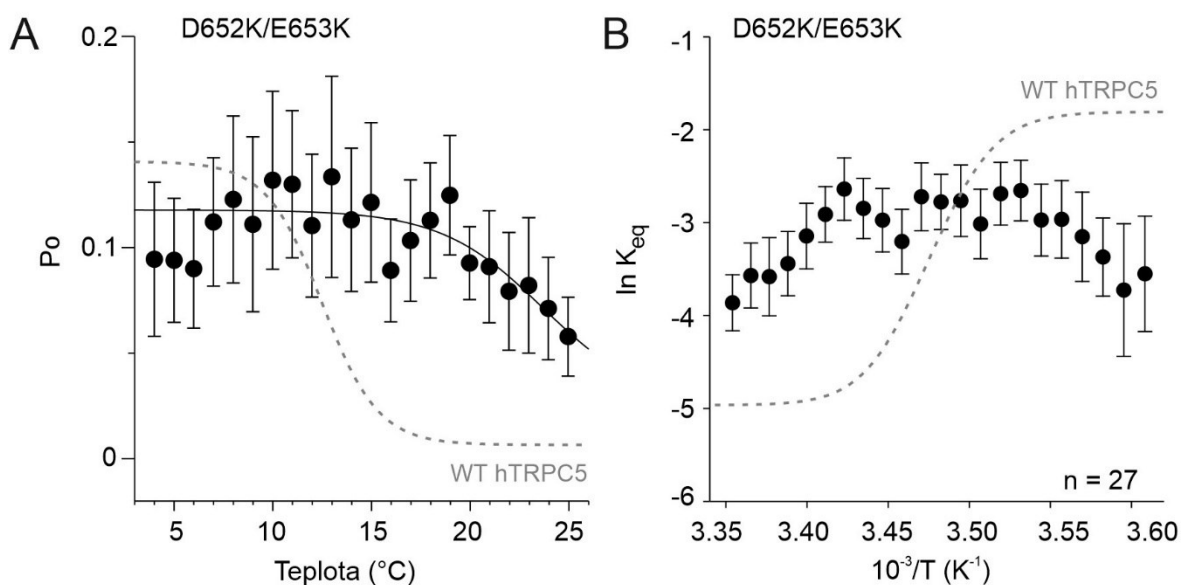
jednou exponenciální funkcí ($\tau_0 = 0,23$ ms), pro stanovení časové konstanty charakterizující rozložení průměrné doby otevření konstruktů D652K/E653K bylo nezbytné použít součet dvou exponenciál ($\tau_{01} = 0,23$ ms a $\tau_{02} = 1,24$ ms). Tento výsledek prokazuje odlišné kinetické chování konstruktů D652K/E653K a naznačuje možnou úlohu STIM1 v teplotně závislé regulaci TRPC5 (Obr. 22D).



Obr. 22 – Teplotní citlivost D652K/E653K TRPC5. (A) Reprezentativní záznam proudových odpovědí D652K/E653K TRPC5 s vyznačeným průběhem změny teploty (nahore). Zvětšené 2s úseky záznamu na indikovaných teplotách (dole). „z“ značí hladinu zavření kanálu a „o“ značí hladinu otevření kanálu. (B) Porovnání dob otevření (P_o) WT ($n = 21$) a D652K/E653K ($n = 27$) TRPC5 při 25 °C (vyneseno na logaritmické stupnici). Krabicový graf znázorňuje rozložení dat mezi 25. a 75. percentilem a medián (vodorovné úsečky). Chybové úsečky označují hodnoty mezi 10. a 90. percentilem. (C) Časové průběhy průměrných dob otevření (nahore) a zavření (dole) měnících se s klesající teplotou, získané ze 6 s dlouhých úseků ze záznamu v (A). (D) Distribuce doby otevření WT a D652K/E653K stanovená na teplotě 25 °C z 21 955 (WT) a 17 828 (D652K/E653K) událostí. Vertikální osa pro WT je vlevo, pro dvojmutant vpravo. Histogramy byly pro porovnání normalizovány na celkový počet událostí.

5. 2. 4 Termodynamická analýza chladové aktivace D652K/E653K TRPC5

V rozmezí teplot 25–15 °C byla pravděpodobnost otevření u D652K/E653K TRPC5 vyšší oproti kanálu přirozeného typu a vykazovala mírnější strmost teplotní závislosti. V teplotním intervalu 15–10 °C se pravděpodobnost otevření neměnila a při ochlazení na teploty nižší než 10 °C se snížila. Tento výsledek prokazuje výrazně nižší chladovou citlivost mutantního kanálu a podporuje tak naši hypotézu o zapojení STIM1 v teplotně závislé regulaci TRPC5 (Obr. 23).

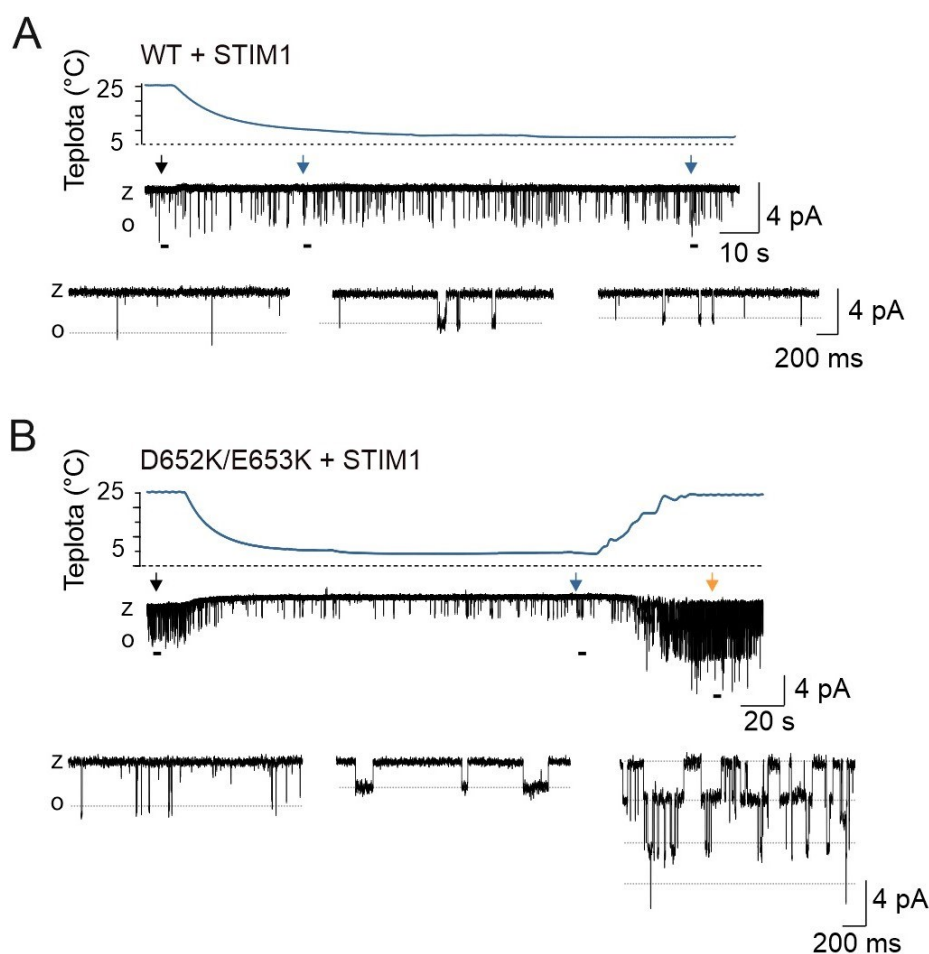


Obr. 23 – Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření D652K/E653K TRPC5. (A) Průměrné hodnoty pravděpodobnosti otevření (P_o) \pm SEM ($n = 27$) vynesené v závislosti na teplotě. (B) Van't Hoffův graf závislosti přirozeného logaritmu rovnovážné konstanty na převrácené hodnotě absolutní teploty. Přerušovaná čára naznačuje teplotní závislost pro WT TRPC5.

5. 2. 5 Nadměrná exprese STIM1 naruší chladovou citlivost TRPC5

Závislost aktivity TRPC5 na STIM1 je určena poměrem, v jakém jsou oba proteiny exprimovány (Lee et. al., 2010). V navazujících experimentech jsme proto zjišťovali, zda účinek STIM1 na chladovou citlivost TRPC5 souvisí s množstvím STIM1 exprimovaného v HEK293T buňkách. Společně jsme exprimovali STIM1 s TRPC5 přirozeného typu nebo s D652K/E653K ve stejném poměru (300 : 300 ng DNA) a stanovili teplotní závislost pravděpodobnosti otevření. U přirozeného typu i u konstruktu D652K/E653K jsme pozorovali nižší aktivitu v celém teplotním rozsahu, přičemž pravděpodobnost otevření byla na

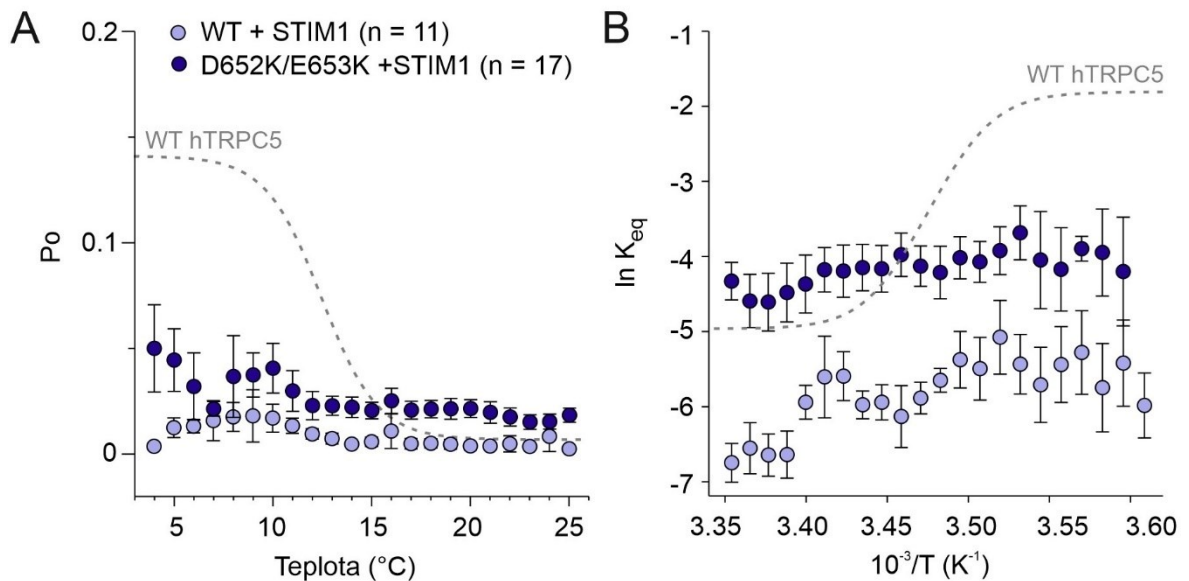
teplotě nezávislá. Záznamy proudových odpovědí u D652K/E653K byly více heterogenní a celková průměrná aktivita konstruktů (+ STIM1) byla vyšší než u přirozeného typu (+ STIM1). Přítomnost exogenního STIM1 neovlivnila amplitudy jednotkových proudů u přirozeného typu ($4,28 \pm 0,12$ pA; 25°C ; $n = 11$; $P = 0,008$; Studentův t-test), zatímco u konstruktů D652K/E653K byly amplitudy nižší ($4,07 \pm 0,14$ pA; 25°C ; $n = 14$; $P > 0,052$; Studentův t-test). Teplotní závislost snižování amplitud proudových odpovědí se v přítomnosti STIM1 nelišila (WT: $Q_{10} = 1,41 \pm 0,02$; $P = 0,245$ a D652K/E653K: $Q_{10} = 1,39 \pm 0,02$; $P = 0,332$; Studentův t-test) (Obr. 24).



Obr. 24 – Vliv exprese STIM1 na aktivitu TRPC5. (A, B) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí (A) WT TRPC5 a (B) D652K/E653K TRPC5 koexprimovaných se STIM1. Průběh změn teplot je naznačen nahoře. Zvětšené 2s úseky záznamu v různých teplotách, jak naznačují šipky (dole). „z“ značí hladinu zavření kanálu a „o“ značí hladinu otevření kanálu.

5. 2. 6 Termodynamická analýza chladové aktivace TRPC5 koexprimovaného se STIM1

Expresse rekombinantního STIM1 vedla k poklesu pravděpodobnosti otevření u TRPC5 přirozeného typu i u konstruktu D652K/E653K (Obr. 25A). Van't Hoffův graf teplotní závislosti přirozeného logaritmu rovnovážné konstanty prokazuje ztrátu specifické teplotní citlivost v obou případech. Teplotní závislost byla u WT TRPC5 koexprimovaného se STIM1 výrazně nižší ve srovnání s D652K/E653K TRPC5 se STIM1 a se samotným WT TRPC5 (Obr. 25B).



Obr. 25 – Teplotní závislosti pravděpodobností otevření WT a D652K/E653K TRPC5 exprimovaných společně se STIM1. (A) Průměrné hodnoty pravděpodobnosti otevření (P_o) \pm SEM vynesené v závislosti na teplotě pro WT (n = 11, světle modrá) a pro D652K/E653K (n = 17, tmavě modrá). (B) Van't Hoffův graf závislosti přirozeného logaritmu rovnovážné konstanty na převrácené hodnotě absolutní teploty. Přerušovaná čára naznačuje teplotní závislost pro WT TRPC5.

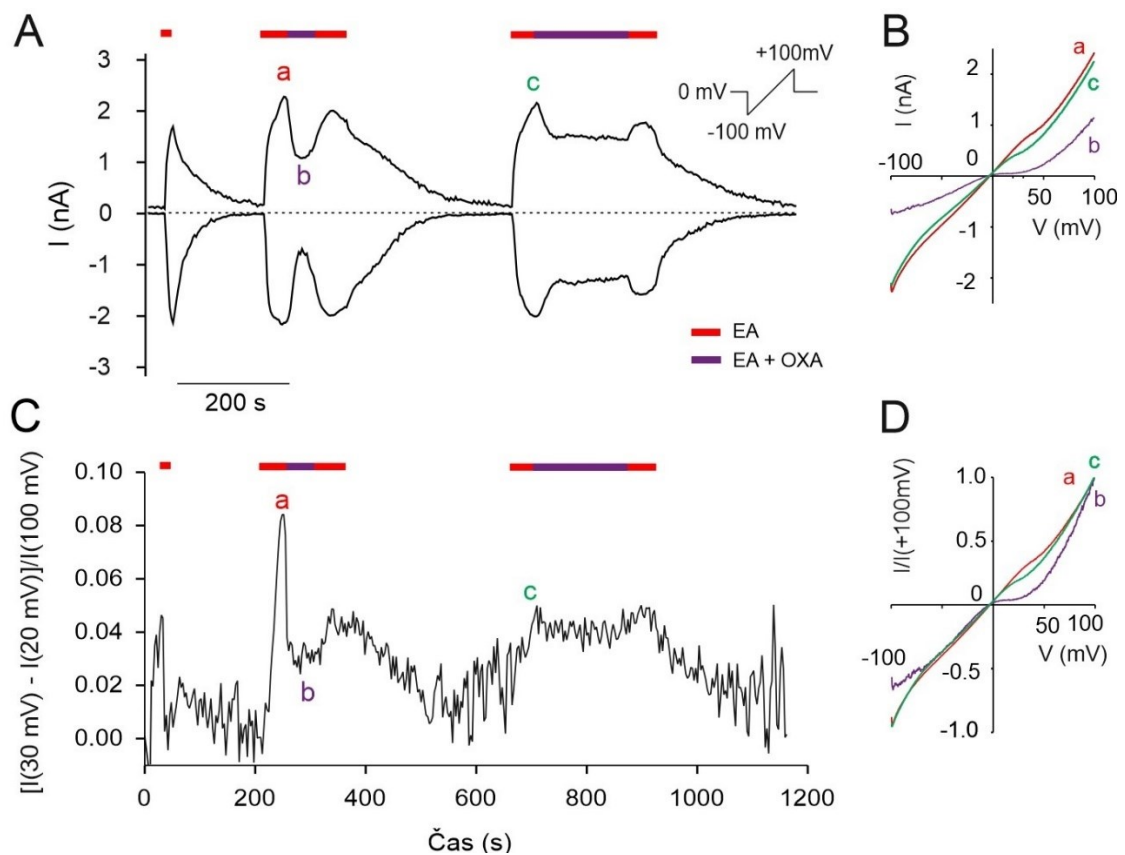
5. 3 Vliv oxaliplatinu na aktivitu TRPC5

5. 3. 1 Inhibiční účinek akutní aplikace oxaliplatinu na TRPC5

Naše výsledky prokazují, že TRPC5 lze přímo aktivovat chladem. Vzhledem k tomu, že tento iontový kanál je exprimován většinou (75 %) primárních aferentních neuronů (Sadler et al. 2021), ověřovali jsme hypotézu, že aktivita TRPC5 může přispívat v rozvoji chladové alodynie způsobené působením platinového cytostatika oxaliplatinu. Testovali jsme účinek oxaliplatinu (150 μ M) na membránové proudy aktivované EA (30nM) s využitím lineárně se zvyšujícího napěťového protokolu (viz kapitola 4.4). Pokusy byly prováděny

v extracelulárním roztoku ECS 1 a skleněná mikropipeta s měřicí elektrodou byla naplněna intracelulárním roztokem ICS.

Při aplikaci oxaliplatinu byly proudové odpovědi vyvolané EA sníženy na kladných i záporných membránových potenciálech a tento účinek byl rychle vratný (Obr. 26A). Proudově-napěťová (I/V) závislost TRPC5 odpovědi byla při první aplikaci EA téměř lineární a působením oxaliplatinu byl proud usměrněn tak, že bylo patrné zakřivení I/V charakteristiky, a to nejvíce v rozsahu membránového potenciálu ~20–40 mV (Obr. 26B). V tomto intervalu se u přirozeného typu TRPC5 uplatňuje blokující účinek Mg^{2+} (Obukhov & Nowycky, 2005). Následná aplikace EA vyvolala odpověď s již pozměněnou charakteristikou I/V závislosti nasvědčující trvalejšímu působení oxaliplatinu (Obr. 26C, D).

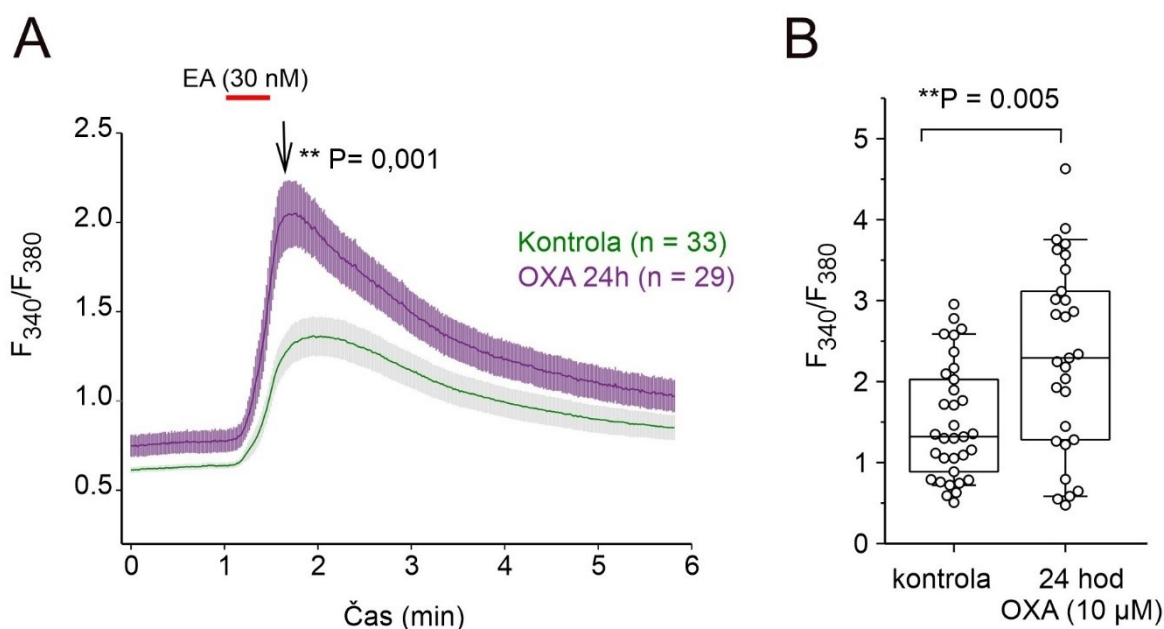


Obr. 26 – Modulace proudové odpovědi WT TRPC5 na EA oxaliplatinou. (A) Reprezentativní záznam proudových odpovědí na EA (30nM; červená horizontální čára) a směs EA s oxaliplatinou (EA 30nM + OXA 150 μ M; fialová horizontální čára). Lineárně se zvyšující napěťový protokol aplikovaný každé 3 s je znázorněn vpravo nahoře. (B) Proudově-napěťová závislost odpovědi TRPC5 získaná z hodnot v časech vyznačených písmeny a, b, c v (A). (C) Časový průběh změn usměrnění napěťově závislých proudů WT TRPC5 ze záznamu v (A). Hodnoty jsou normalizované na hodnotu proudu měřenou při +100 mV. (D) Proudově-napěťová závislost odpovědi TRPC5 získaná z hodnot v časech vyznačených písmeny a, b, c v (C).

5. 3. 2 Inkubace v oxaliplatině zvyšuje aktivitu TRPC5

Přestože pozorované změny v aktivitě TRPC5 způsobené působením oxaliplatiny mají přetrvávající účinek, nemohou být podstatou zvýšené excitability neuronů v případě trvalého působení. Metodou zobrazování změn koncentrací intracelulárního Ca^{2+} (calcium imaging) jsme proto zkoumali vliv 24h inkubace HEK293T buněk exprimujících WT TRPC5 v médiu s $10\mu\text{M}$ oxaliplatinou. Experimenty byly prováděny v kontrolním extracelulárním roztoku ECS 1 a pro potvrzení aktivity TRPC5 byl použit agonista EA (10nM).

Inkubace v oxaliplatině mírně zvýšila bazální hladinu vnitřního Ca^{2+} . Průměrná maximální hodnota relativní fluorescence byla při odpovědi na EA významně vyšší u buněk inkubovaných v oxaliplatině ($2,32 \pm 0,22$; $n = 29$) oproti kontrolním buňkám ($1,49 \pm 0,12$; $n = 33$; $P = 0,001$; Studentův t-test) (Obr. 27).

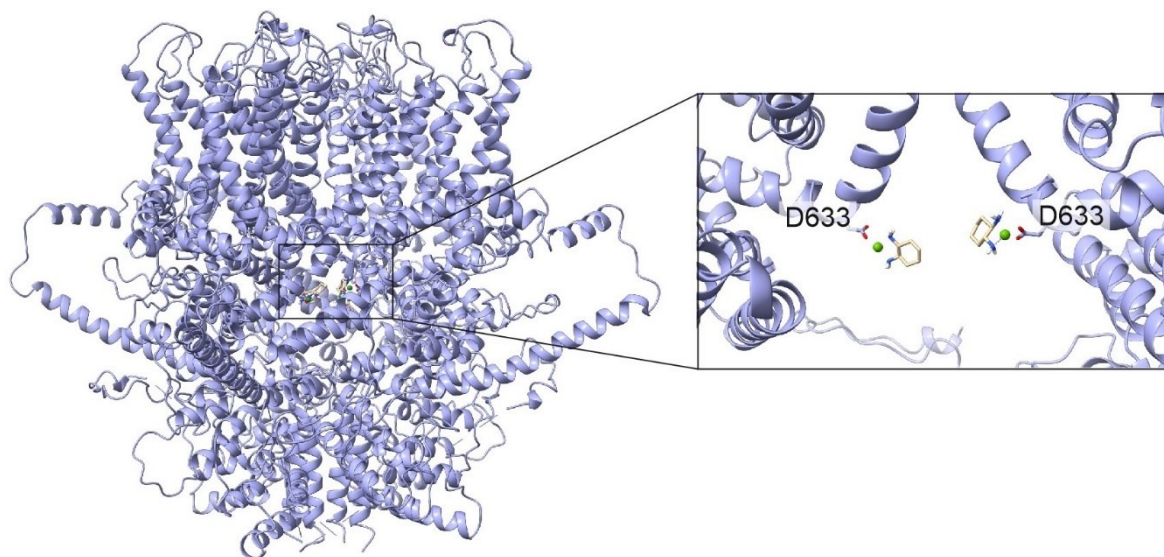


Obr. 27 – Vliv 24h inkubace WT TRPC5 v oxaliplatině na hladinu intracelulárního Ca^{2+} . (A) Časový průběh změn koncentrací intracelulárního Ca^{2+} při odpovědi na EA (10nM) u buněk inkubovaných 24 h v oxaliplatině ($10\mu\text{M}$; fialově) a u buněk inkubovaných pouze v kontrolním médiu (zeleně). Zobrazené jsou průměrné hodnoty \pm SEM. (B) Krabicový graf průměrných maximálních hodnot relativní fluorescence znázorňuje rozložení dat mezi 25. a 75. percentilem a medián (vodorovné úsečky). Chybové úsečky označují hodnoty mezi 10. a 90. percentilem.

5. 3. 3 Molekulární modelování

5. 3. 3. 1 Blokující účinek oxaliplatin

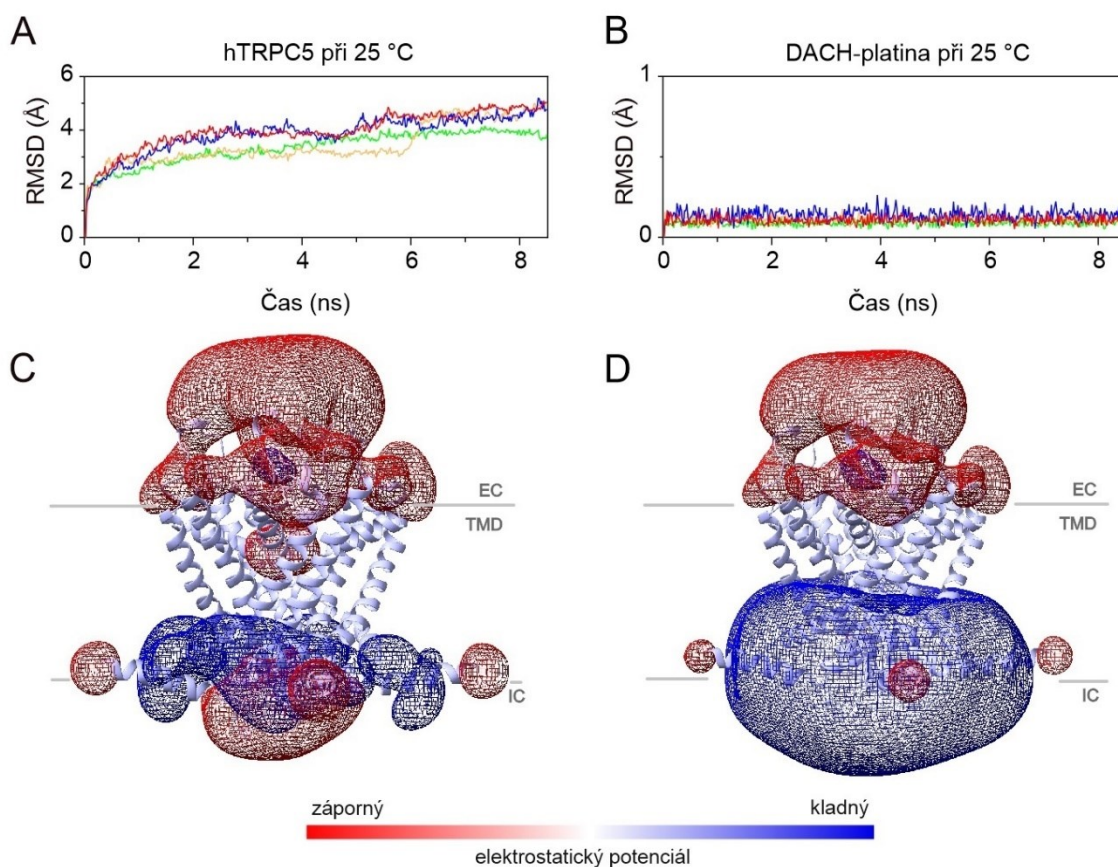
Naše výsledky prokázaly, že oxaliplatina může blokovat kanál TRPC5 a tento účinek je okamžitě vratný. I/V závislost proudových odpovědí poukazuje na změnu rektifikace kanálu především v intervalu napětí, při kterém se u TRPC5 projevuje blokující účinek Mg^{2+} (Obukhov & Nowycky, 2005) (Obr. 26, str. 56). Metodami molekulárního modelování (viz kapitola 4.6.2) byla prozkoumána možnost interakce DACH-platiny (aktivní forma oxaliplatin) s negativně nabitým reziduem D633 v intracelulární oblasti póru (Obr. 28), které je klíčové při inhibici Mg^{2+} . DACH-platina se kromě tvorby aduktů na DNA ochotně váže i na další makromolekuly v buňce včetně proteinů, přičemž právě aspartát je jedním z reziduí, u kterých byla potvrzena možnost vazby DACH-platiny (Messori et al., 2015).



Obr. 28 – Potenciální místo interakce DACH-platiny s TRPC5. Aktivní forma oxaliplatin interagující s reziduem D633 ve vnitřním vestibulu póru TRPC5 ve spuštěné simulaci. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3.

Zatímco se v průběhu 8,5ns simulace (při 25 °C) blížil celý systém rovnováze (Obr. 29A, str. 59), byla hodnota RMSD (střední kvadratická odchylka) molekuly DACH-platiny interagující s D633 (v každé ze čtyř podjednotek kanálu) téměř konstantní (Obr. 29B, str. 59), což odráží stabilitu struktury a podporuje hypotézu vazby DACH-platiny k příslušnému aspartátu. Vazba DACH-platiny na D633 mění náboj v dolní oblasti póru. Elektrostatický potenciál v transmembránové části TRPC5 s navázanou DACH-platinou

ukazuje, že dolní vestibul se stává kladně nabitým, čímž může bránit průchodu kationtů (Obr. 29D).

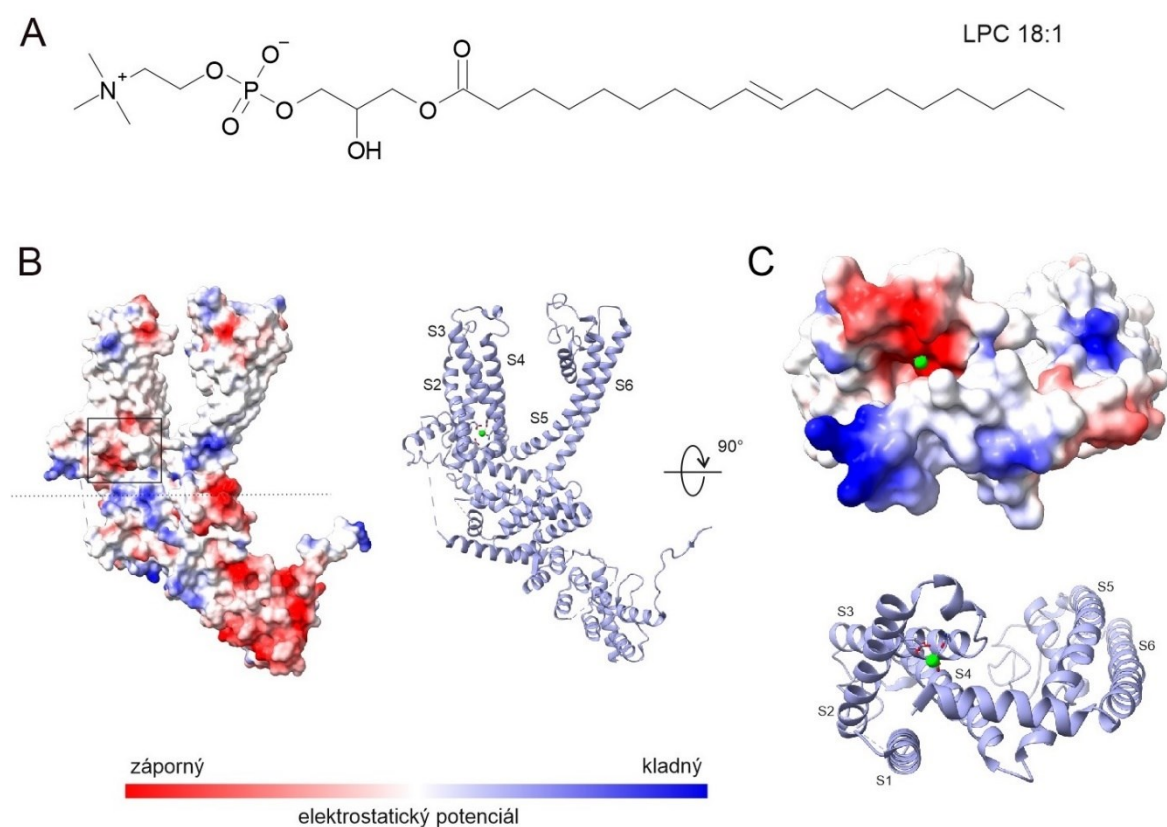


Obr. 29 – Možná vazba DACH-platiny do oblasti vnitřního vestibulu póru a její vliv. (A, B) Časový průběh RMSD (střední kvadratické odchylky) pro celý protein (A) a pro molekulu DACH-platiny (B). Trajektorie byly získány při 25 °C. Hodnoty RMSD pro jednotlivé podjednotky TRPC5 jsou znázorněny odlišnými barvami. (C, D) Znáznornění elektrostatického potenciálu v transmembránové oblasti TRPC5 bez (C) a v přítomnosti DACH-platiny interagující s D633 (D). Zobrazeny jsou pouze S5 a S6 helixy každé ze 4 podjednotek. Červeně je znázorněn záporný a modře kladný elektrostatický potenciál. EC – extracelulární prostor, TMD – transmembránová doména, IC – intracelulární prostor. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3.

5. 3. 3. 2 Hledání vazebného místa pro LPC 18:1

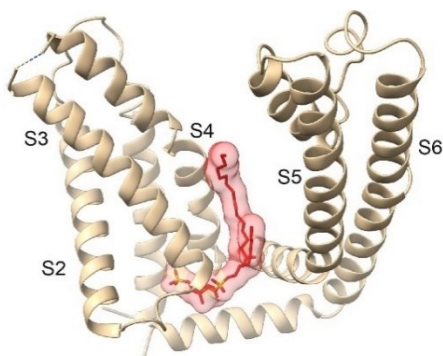
Jedním z mechanismů vzniku OIPN je aktivace kanálů TRPV1 a TRPM8 působením LPC 18:1, jehož koncentraci zvyšuje oxaliplatin v DRG neuronech po 24 h působení (Rimola et al., 2020). Ve snaze objasnit mechanismus námi pozorovaného zvýšení aktivity TRPC5 vlivem 24h inkubace v oxaliplatině (Obr. 27, str. 57) jsme se pomocí metod molekulárního modelování (viz kapitola 4.6.1) pokusili prozkoumat možnost přímé interakce receptoru s LPC 18:1.

Potenciální vazebné místo pro LPC 18:1 bylo vytipováno na základě strukturní homologie s jinými TRP kanály, v jejichž zveřejněných strukturách byly odhaleny navázané lipidy podobné LPC 18:1. Pozornost byla soustředěna zejména na transmembránovou oblast, a to především na oblast sensorové domény (helixy S1–S4), čemuž napovídala i mapa elektrostatického potenciálu TRPC5 (Obr. 30B, C). LPC 18:1 má kladně nabitou hlavičku (Obr. 30A), která by mohla interagovat s receptorem v oblasti s významným podílem záporně nabitých reziduí mezi helixy S2 a S3, kde se jinak vyskytuje aktivační kationtové vazebné místo (viz kapitola 2.2.1.2). Doposud bylo publikováno 6 struktur TRPC5 kanálu (PDB: 7E4T, 7D4Q, 7D4P, 6AEI, 6YSN, 7WDB) (Duan et al., 2019; Song et al., 2021; Wright et al., 2020), z toho ve 4 strukturách (7E4T, 7D4Q, 7D4P, 7WDB) bylo odhaleno několik vazebných míst pro lipidy v oblasti sensorové domény (mezi helixy S1–S6), ale zatím žádná strukturní studie nepopsala vazebné místo pro LPC 18:1.



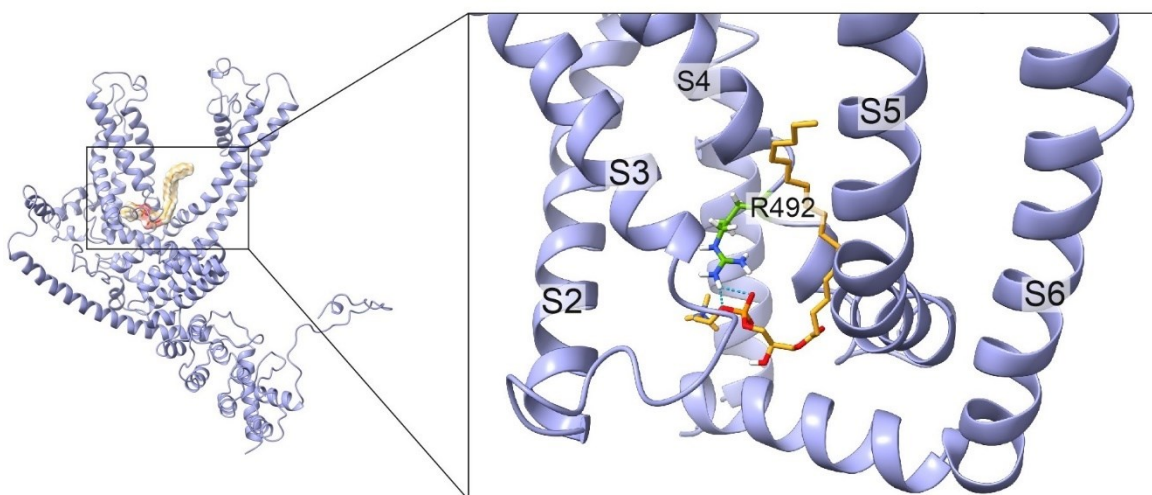
Obr. 30 – LPC 18:1 a mapa elektrostatického potenciálu podjednotky TRPC5. (A) Strukturní vzorec LPC 18:1. Vytvořeno v programu ChemSketch. (B, C) Elektrostatický potenciál jedné podjednotky TRPC5 kanálu z boku (B) a spodní pohled na oblast transmembránové části podjednotky (C). Červeně je znázorněn záporný a modře kladný elektrostatický potenciál. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3.

Takto orientovaný lipid (navázaný mezi S2, S3 a S4 helixy) byl nalezen např. ve struktuře kanálu TRPY1 z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 6WHG) (Ahmed et al., 2022) (Obr. 31).

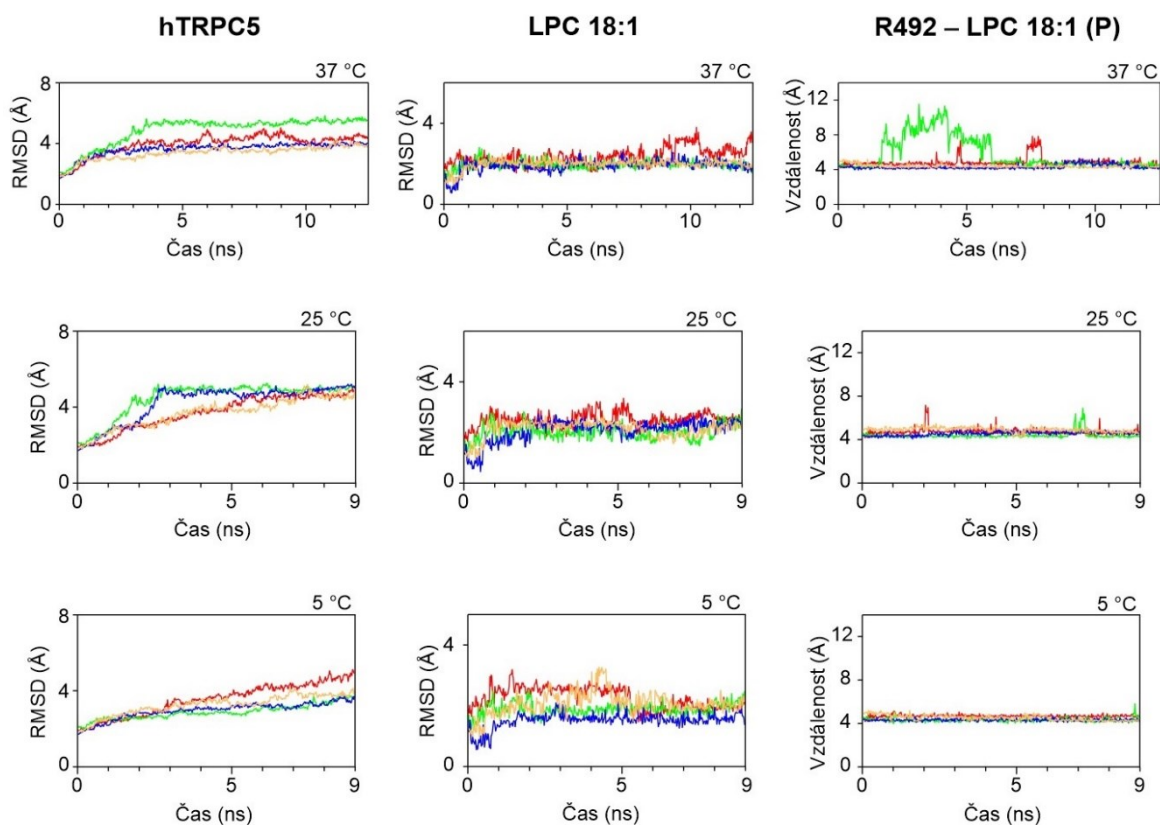


Obr. 31 – Lipidové vazebné místo TRPY1. Lipid navázaný mezi transmembránovými helixy TRPY1 kanálu (PDB: 6WHG, lipid PWE). Zobrazena je pouze transmembránová oblast jedné podjednotky. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3.

V MD simulacích TRPC5 receptoru s molekulou LPC 18:1 ve výtípaném prostoru sensorové domény podle vzoru na Obr. 31 se hodnota RMSD LPC 18:1 s časem téměř nezměnila. Tento jev jsme pozorovali při třech různých teplotách (37, 25 a 5 °C, Obr. 33, str. 62). Výsledky tak podporují návrh potenciální vazby LPC 18:1 do této oblasti TRPC5 kanálu. Vzdálenost mezi kladně nabitým reziduem receptoru R492 a fosforem v záporně nabitě fosfátové skupině molekuly LPC 18:1 (Obr. 32) byla po celou dobu simulace konstantní, a to především v chladu (5 °C, viz Obr. 33, str. 62), což naznačuje význam R492 při stabilizaci lipidu.

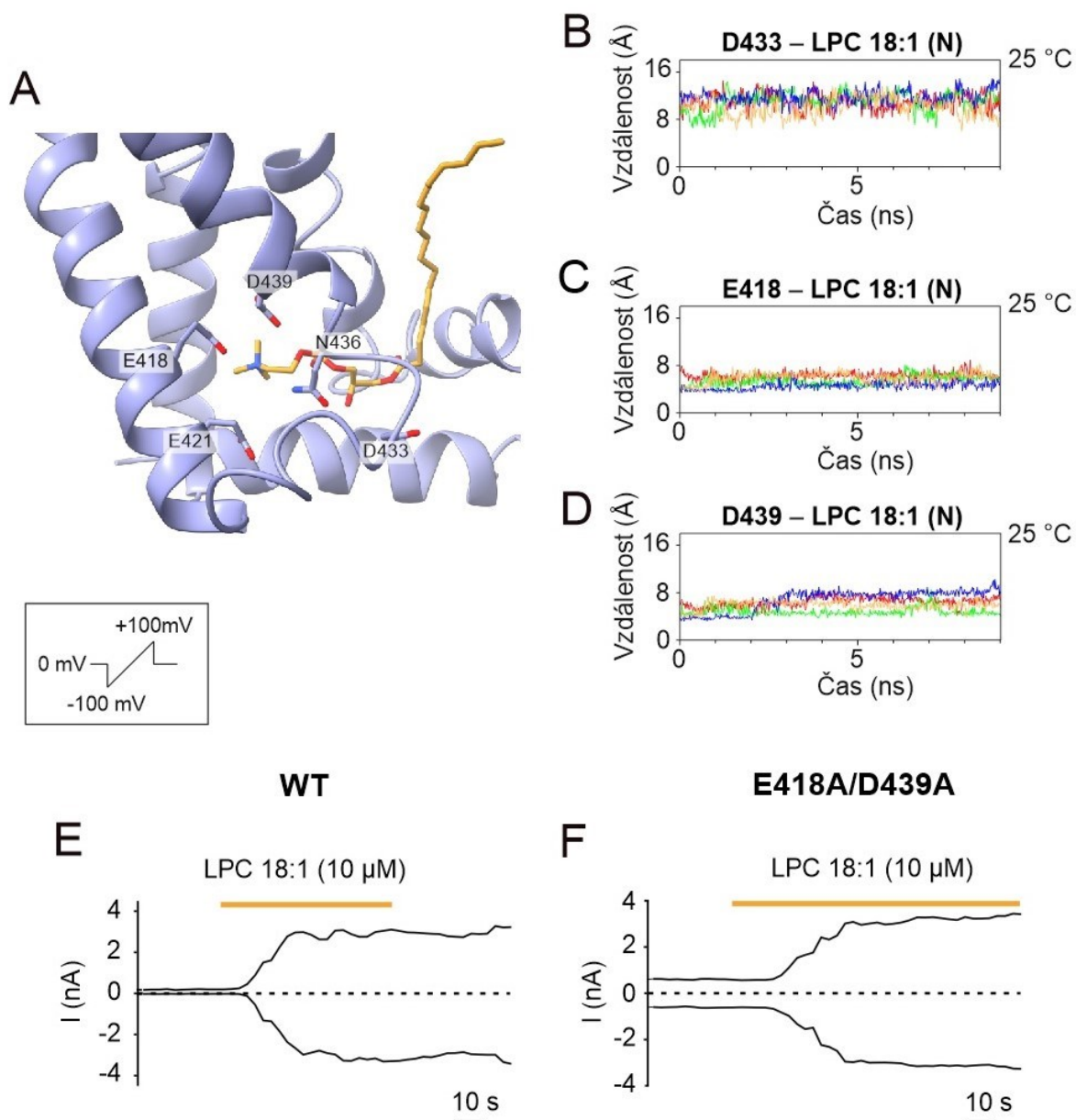


Obr. 32 – Molekula LPC 18:1 interagující s R492. Vzájemná orientace R492 a LPC 18:1 ve spuštěných MD simulacích. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3.



Obr. 33 – Časový průběh změny RMSD a vzdálenosti. Časový průběh změny RMSD pro celý protein (levý sloupec), pro molekulu LPC 18:1 (uprostřed) a časový průběh změny vzdálenosti mezi kladně nabitým reziduem receptoru R492 a fosforem v záporně nabitě fosfátové skupině molekuly LPC 18:1 (vpravo). Trajektorie byly získány při 37 °C (o délce 12,5 ns), 25 °C (9 ns) a 5 °C (9 ns) pro každou ze čtyř podjednotek. Hodnoty RMSD a vzdáleností jsou pro jednotlivé podjednotky TRPC5 znázorněny odlišnými barvami.

Časový vývoj vzdáleností záporně nabitých aminokyselinových zbytků TRPC5 (E418, E421, D433, D439) od kladně nabitého dusíku v molekule LPC 18:1 nepotvrdil předpoklad, že jsou tato rezidua klíčová při udržení lipidu v sensorové doméně. Vzdálenosti přesahují 4 Å, tzn. není splněna podmínka vzniku solných můstků (Obr. 34B–D, str. 63). Potvrzují to i výsledky elektrofyziologických měření proudových odpovědí TRPC5 vyvolaných působením LPC 18:1 (10 μ M). Odpovědi TRPC5 konstruktů s neutralizovanými výše uvedenými rezidui si zachovaly citlivost k LPC 18:1 (Obr. 34E, F; str. 63).



Obr. 34 – LPC 18:1 neinteraguje s TRPC5 v kationtovém vazebném místě. (A) Molekula LPC 18:1 ve vytipované oblasti sensorové domény TRPC5 ve spuštěných MD simulacích. Zobrazena jsou rezidua předpokládané interakce s LPC 18:1. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.3. (B–D) Časový průběh vzdáleností vybraných záporně nabitých reziduí od dusíku LPC 18:1. Trajektorie byly získány při 25 °C. Hodnoty vzdáleností pro každou podjednotku TRPC5 jsou znázorněny odlišnou barvou. (E–F) Záznamy proudových odpovědí TRPC5 na LPC 18:1 (10 μM) u přirozeného typu (E) a u konstruktů E418A/D439A (F). Žlutý symbol značí dobu aplikace LPC 18:1. Lineárně se zvyšující napěťový protokol aplikovaný každé 3 s je znázorněn vlevo v rámečku.

6 Diskuze

6.1 Chladem modulovaná aktivace TRPC5 iontového kanálu

V této práci se podařilo popsat parametry chladové aktivace lidského iontového kanálu TRPC5 exprimovaného v HEK293T buňkách. Snímáním membránových proudů z celých buněk jsme odhalili, že s klesající teplotou se snižuje amplituda a zpomaluje deaktivace proudové odpovědi vyvolané agonistou TRPC5 (EA), přičemž celkový přenesený náboj kanálem je v chladu vyšší. Na úrovni jednotlivých kanálů bylo se snížením teploty možné pozorovat celkové zvýšení pravděpodobnosti otevření kanálu odrážející prodloužení doby otevření a zkrácení doby zavření (Obr. 14–16). Nejvyšší chladovou citlivost vykazoval TRPC5 v rozmezí teplot 16–11 °C, kdy se kanál otevíral a zavíral s teplotním koeficientem $Q_{10} \sim 0,04$ (Obr. 16). Tyto hodnoty jsou nižší než hodnoty publikované zatím v jediné studii zabývající se popisem parametrů chladové aktivace TRPC5 (Zimmermann et al., 2011). V rámci této studie byl zkoumán myší ortolog TRPC5 exprimovaný společně s lidským muskarinovým receptorem M_1 v HEK293 buňkách. Měřením aktivity na úrovni membránových proudů snímaných z celé buňky byla zjištěna nejvyšší chladová závislost TRPC5 v rozsahu teplot klesajících z 37 °C na 25 °C, zatímco hodnota Q_{10} se pohybovala okolo 0,1. V našich experimentech jsme aktivitu TRPC5 měřili na úrovni jednotlivých kanálů, zatímco Zimmermann et. al (2011) zvolili přístup snímání celkových proudů, v němž byl nitrobuněčný obsah buněk vyměněn za experimentální roztok obsahující chelatační činidlo BAPTA (1,2-bis(o-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina), ATP a GTP. Dalším rozdílem, který mohl ovlivnit teplotní citlivost kanálů, byl rozsah teplot, ve kterých byly pokusy prováděny. Při výchozí teplotě 25 °C v našich experimentech kanál nevykazoval výraznou aktivitu. Poté jsme teplotu postupně snižovali na 5 °C, přičemž následné zvýšení teploty zpět na 25 °C vedlo k silné aktivaci TRPC5 (Obr. 19). Vzhledem k tomu, že jsme buňky exprimující TRPC5 inkubovali 24–48 h při 37 °C před zahájením experimentu a před samotným měřením jsme je umístili na několik minut do extracelulárního roztoku s 25 °C, mohlo dojít k adaptaci na teploty v tomto rozmezí a TRPC5 reagoval až na akutní změny teploty. Chladovou aktivaci kanálu jsme pozorovali nejen v kontrolním extracelulární roztoku (ECS 2), ale i za trvalé aplikace aktivátorů TRPC5 (EA a karbacholu). Podobně jako v pokusech prováděných s kontrolním ECS 2, i v přítomnosti aktivátorů se pravděpodobnost otevření s klesající teplotou zvyšovala, nicméně působením aktivátorů se snížila chladová citlivost TRPC5 a změna pravděpodobnosti otevření při ochlazení byla

podstatně nižší ($Q_{10} \sim 0,53$ pro EA a $\sim 0,44$ pro karbachol) (Obr. 18). Podobný účinek, kdy aplikace chemických agonistů sníží práh teplotní citlivosti, byl pozorován i u jiných thermoTRP (Vriens et al., 2014).

6. 2 Vliv signalizačních drah na chladovou citlivost TRPC5

Otázkou také bylo, zda je námi popsaná chladová aktivace TRPC5 ovlivněna vnitrobuněčnými procesy, nebo zda jde o vlastnost kanálu samotného. Nejdříve jsme prozkoumali možné zapojení signalizační kaskády $G_{q/11}$ proteinů, u které byl již dříve prokázán vliv na regulaci aktivity TRPC5 při pokojové teplotě (viz kapitola 2.2.1.3). Bodovou mutagenézí jsme vytvořili konstrukt lidského TRPC5, u kterého byl nahrazen threonin na pozici 970 za alanin. Fosforylace T970 prostřednictvím PKC vede k inaktivaci kanálu (Zhu et al., 2005). T970 se vyskytuje na C-konci TRPC5 receptoru a je součástí tzv. PDZ-vazebného motivu. Fosforylací tohoto rezidua je umožněna vazba TRPC5 s proteinem NHERF1/2, který udržuje kanál v inaktivní stavu (Storch et al., 2017). V případě, kdy jsme mutací T970A zabránili fosforylaci TRPC5, vykazoval kanál vyšší bazální aktivitu při 25 °C oproti kanálu přirozeného typu a zároveň se choval méně závisle na teplotě ($Q_{10} \sim 0,22$) (Obr. 20, 21).

Aktivitu TRPC5 ovlivňují změny intracelulárních i extracelulárních hladin vápenatých iontů (Blair et al., 2009; Gross et al., 2009; Zeng et al., 2004). STIM1 je Ca^{2+} -citlivý senzor vyskytující se v membráně ER, kde reaguje na vyčerpání vnitřních zásob Ca^{2+} tvorbou klastrů s dalšími molekulami STIM1. Následně interaguje s kanály Orai1 a TRPC5 a otevírá je, čímž zajistí vtok Ca^{2+} z okolí do buňky (Lee et al., 2010). Vznik klastrů STIM1 na membráně ER je teplotně závislý a může být vyvolán zvýšením teploty nad 35 °C, bez ohledu na změny hladin Ca^{2+} v ER. Během následného ochlazení aktivuje STIM1 kanál Orai1 (Xiao et al., 2011). TRPC5 z tohoto hlediska zatím studován nebyl. STIM1 se na TRPC5 váže pomocí vazebné domény SOAR a oba proteiny spolu interagují i elektrostaticky nabitými rezidui na C-koncích (dva kladně nabitě lysiny proteinu STIM1 spolu se záporně nabitými rezidui D652 a E653 TRPC5 kanálu) (Lee et al., 2010). V našich experimentech vedla záměna záporných reziduí za lysiny ke ztrátě chladové citlivosti kanálu. Pravděpodobnost jeho otevření byla při 25 °C vyšší v porovnání s kanálem přirozeného typu a zůstala zvýšená i s poklesem teploty na 15 °C (Obr. 22, 23). Míra regulace aktivity TRPC5 proteinem STIM1 závisí na poměru jejich množství v buňce (Lee et al., 2010). Naše výsledky odhalují útlum aktivity TRPC5 v celém teplotním rozsahu vlivem koexpresy STIM1 ve stejném poměru (300 : 300 ng DNA). Sníženou aktivitu jsme pozorovali u

přirozeného typu i u mutantního konstruktů (D652K/E653K), ačkoliv v případě přirozeného typu byl pokles aktivity výraznější. Oba kanály také ztratily svou specifickou chladovou citlivost (Obr. 24, 25). Schopnost chladové aktivace je tedy u TRPC5 významně modulována proteinem STIM1. V endogenním množství (v HEK293T buňkách) se STIM1 svou elektrostatickou interakcí s TRPC5 podílí na mírné inhibici kanálu patrně při 25 °C, zatímco při nadměrné expresi tlumí STIM1 aktivitu TRPC5 v celém teplotním rozsahu. Protože se efekt projevil i u mutantního konstruktů D652K/E653K, je regulace aktivity při velkém množství STIM1 pravděpodobně závislá zejména na interakci obou proteinů prostřednictvím SOAR domény, bez ohledu na elektrostatickou interakci. Snaha podrobně popsat mechanismus této regulace je komplikovaná také tím, že se může TRPC5 kanál chovat závisle i nezávisle na STIM1 (Lee et al., 2010).

6.3 Vliv oxaliplatinu na aktivitu TRPC5

Jedním z významných experimentálních modelů výzkumu mechanismů chladové bolesti je oxaliplatinou vyvolaná periferní neuropatie. Ačkoliv bylo dokázáno zapojení některých TRP kanálů v mechanismech jejího vzniku (viz kapitola 2.4.2), potenciální role TRPC5 je téměř neprozkoumaná. Pouze jedna studie sledovala úlohu TRPC5 (společně s možnou úlohou kanálů TRPA1 a TRPM8) při projevech chladové alodynne vyvolané oxaliplatinou. Experiment byl prováděn s využitím farmakologické inhibice kanálů a delece genů pro příslušné proteiny u myši a nebyl prokázán význam ani jednoho ze zmíněných kanálů v tomto procesu (Deuis et al., 2013). V literatuře také chybí popis přímého vlivu oxaliplatinu na TRPC5 na buněčné a molekulární úrovni. Působení oxaliplatinu na HEK293T buňky exprimující TRPC5 se v našich pokusech projevilo akutní inhibicí proudových odpovědí vyvolaných agonistou (EA) a tento efekt byl rychle vratný. Došlo k usměrnění proudu, což se nejvíce projevilo při membránovém potenciálu v rozmezí 20–40 mV (Obr. 26). Ve stejném rozsahu napětí je TRPC5 přirozeného typu přechodně blokován Mg^{2+} interagujícím v pórové oblasti s reziduem D633 (Obukhov & Nowycky, 2005). Na základě našich výsledků se dá předpokládat, že oxaliplatin může TRPC5 akutně blokovat ve vnitřní oblasti póru obdobně jako Mg^{2+} . MD simulace (8,5 ns při 25 °C) TRPC5 receptoru s DACH-platinou interagující s D633 podporuje možnost vazby aktivní formy oxaliplatinu právě v této oblasti. Naše simulace ukazuje, že vazba DACH-platinu mění elektrostatický náboj vnitřního vestibulu póru, a tím může bránit průchodu kationtů (Obr. 29).

Periferní neuropatie se u pacientů léčených oxaliplatinou objevuje několik hodin až dní po první aplikaci (Gebremedhn et al., 2018) a námi pozorovaný akutní inhibiční účinek nemusí být v tomto mechanismu podstatný. 24h inkubace buněk exprimujících TRPC5 zvýšila hladinu intracelulárního Ca^{2+} a odpověď na EA byla u buněk vystavených oxaliplatině signifikantně vyšší oproti kontrolním buňkám (Obr. 27). Vliv oxaliplatiny byl již popsán u některých TRP kanálů a dá se předpokládat, že mechanismus jejího působení bude v případě TRPC5 obdobný. Např. oxaliplatina vytváří adukty na mitochondriální DNA a tím zvyšuje oxidativní stres (Di Cesare Mannelli et al., 2013), který aktivuje kanál TRPA1 (Miyake et al., 2017). S ohledem na silnou závislost aktivity TRPC5 na redoxním stavu buňky (Yoshida et al., 2006) můžeme očekávat podobný vliv oxaliplatiny na tento kanál. TRPA1 je aktivován také snížením nitrobuněčného pH, které oxaliplatina vyvolává (Riva et al., 2018), což by se na modulaci aktivity pH-citlivého TRPC5 (Cui et al., 2011) mohlo také podílet. Mimo to oxaliplatina ovlivňuje hladiny vápenatých kationtů, a to modulací aktivity Ca_v kanálů (Schmitt et al., 2018) a produkcí oxalátu, který se chová jako chelatační činidlo (Sakurai et al., 2009).

6. 4 Vliv LPC 18:1 na aktivitu TRPC5

Jednou z příčin vzniku periferní neuropatie je oxaliplatinou zvýšená hladina některých fosfolipidů, včetně lysofosfatidylcholinu 18:1, který aktivuje kanály TRPA1 a TRPM8 v DRG neuronech (Rimola et al., 2020). Schopnost LPC 18:1 a dalších fosfolipidů aktivovat TRPC5 dokázali Flemming et. al (2006). Zda je TRPC5 aktivován přímou vazbou LPC 18:1 na receptor, nebo jde spíše o stimulaci prostřednictvím ovlivnění vlastností membrány v jeho okolí, není známo. Ve zveřejněných strukturách TRP kanálů bylo odhaleno značné množství lipidových vazebných míst, nicméně interakce kanálů s LPC 18:1 nebyla prověřena. Na základě strukturní homologie s jinými kanály a s ohledem na jejich zveřejněné struktury zahrnující různé lipidy jsme u TRPC5 vytypovali potenciální vazebné místo pro LPC 18:1, a to v sensorové doméně mezi helixy S1–S4. MD simulace odhalily možnou vazbu záporně nabitého fosfátu LPC 18:1 s reziduem R492, která by se mohla podílet na udržení lipidu v této oblasti. Tento výsledek nebylo v našich pokusech možné ověřit experimentálně, protože mutant R492A nebyl funkční (Zimova et al., 2022). Vzdálenost mezi fosfátem lipidu a R492 byla téměř konstantní v průběhu celých simulací při 37, 25 a 5 °C, nicméně při 5 °C byla vazba molekuly LPC 18:1 v některých podjednotkách kanálu výrazně stabilnější než při 37 °C. Podobný jev byl pozorován u TRPV3 receptoru, jehož aktivační práh je >42 °C. Nedávnou strukturní studií bylo odhaleno, že lipid vázaný

ve vaniloidním místě receptoru (mezi sensorovou doménou tvořenou S1–S4 jedné podjednotky a helixy S5 a S6 druhé podjednotky) je přítomný pouze ve struktuře zavřeného TRPV3 (PDB: 7MIN, lipid: POV4), nikoliv však ve struktuře otevřeného stavu (PDB: 7MIO). Teplem vyvolané konformační změny některých oblastí TRPV3, při kterých se naruší vazba s lipidem, jsou nezbytné pro následné otevření kanálu (Nadezhdin et al., 2021). Je otázkou, zda by v případě chladem aktivovaného TRPC5 byla vazba lipidů v této oblasti naopak důležitá pro aktivaci. Náš původní předpoklad, že kladně nabitá hlavička LPC 18:1 by v aktivačním kationtovém vazebném místě sensorové domény mohla nahrazovat kationt a byla by koordinována rezidui E418, N436, D439 (viz kapitola 2.2.1.2) nepotvrzují výstupy z MD simulací. Naše výsledky elektrofyziologických měření naznačují, že se ani jedno z těchto reziduí na stabilizaci LPC 18:1 v senzoru nepodílí (Obr. 34). Vazba LPC 18:1 do některého z jiných lipidových vazebných míst není vyloučena. Nabitá hlavička lipidu by mohla být orientována mimo sensorovou doménu, podobně jako lipid v nově zveřejněné struktuře TRPC5 (PDB: 7WDB, lipid: PTY). Možné vysvětlení otázky, jak by mohl LPC 18:1 v této oblasti aktivovat TRPC5, nabízí výsledky studie, kterou prováděli Gao et. al (2016) na kanálu TRPV1, kde zdůraznili rozdíly vlivu lipidů s jedním a s dvěma uhlíkovými řetězci. Lipid s jedním řetězcem umožnil pohyb S4-S5 linkeru důležitý pro otevření spodních vrátek kanálu. LPC 18:1 má jen jeden uhlíkový řetězec a v případě, kdy by nahradil lipid s dvěma řetězci, jakým je např. lipid PTY ve struktuře 7WDB, by mohl uvolnit prostor pro pohyb S5 a S6 helixů sousední podjednotky, a tím zajistit otevření kanálu. Jinou možností vazby LPC 18:1 je oblast vnějšího póru, kde s kanálem interagují xantinové deriváty, např. inhibitor TRPC1, TRPC4 a TRPC5 receptorů – Pico145 (Wright et al., 2020).

7 Závěr

1. Elektrofyziologickou metodou terčíkového zámku se nám podařilo popsat parametry chladové aktivace lidského TRPC5 kanálu v intaktních buňkách. Nejvyšší chladovou citlivost vykazuje TRPC5 mezi 16–11 °C, čemuž odpovídají i vysoké změny entalpie a entropie a nízká hodnota teplotního koeficientu $Q_{10} \sim 0,04$. S klesající teplotou se snižuje amplituda proudových odpovědí, zatímco se prodlužuje doba otevření a zkracuje se doba zavření kanálu. S poklesem teploty z 25 °C na 8 °C se zvyšuje pravděpodobnost otevření TRPC5 a při dalším snížení teploty se aktivita kanálu již nemění, případně má tendenci se snižovat.
2. Aktivita TRPC5 kanálu je mírně potlačena fosforylací threoninu 970 a tato fosforylace je nezbytná pro udržení chladové citlivosti kanálu. Protein STIM1 endogenně exprimovaný v HEK293T buňkách inhibuje aktivitu kanálu především při 25 °C. V případě nadměrné exprese proteinu STIM1 se projeví jeho inhibiční účinek v širším rozmezí teplot (25–5 °C). Inhibice zprostředkovaná STIM1 se odráží na snížení chladové citlivosti TRPC5. Výsledky zmíněné v bodech 1. a 2. byly publikovány v článku, který je v příloze 1.
3. Oxaliplatina aplikovaná na TRPC5 v klinicky relevantních koncentracích akutně inhibuje proudové odpovědi na agonistu EA a tento účinek je přechodný. Proudově-napěťová závislost odpovědí TRPC5 nasvědčuje možné vazbě aktivní formy oxaliplatiny do vnitřní oblasti póru. Záznamy změn intracelulárních koncentrací Ca^{2+} odhalují, že 24h inkubace buněk exprimujících TRPC5 v oxaliplatině vede ke zvýšení bazální hladiny vápenatých iontů. Vlivem aplikace agonisty EA je nárůst vnitřní koncentrace Ca^{2+} signifikantně vyšší u buněk vystavených oxaliplatině oproti kontrolním buňkám.
4. Molekulárně-dynamické simulace komplexů oxaliplatiny s TRPC5 navrhují vysvětlení mechanismu jejího působení: akutní inhibice proudových odpovědí může být způsobena změnou elektrostatického náboje ve vnitřním vestibulu póru v důsledku navázání aktivní formy oxaliplatiny. TRPC5 může mít potenciální vazebné místo pro LPC 18:1 vznikající působením oxaliplatiny. LPC 18:1 by mohl s kanálem interagovat v oblasti senzorové domény prostřednictvím rezidua argininu 492, a tím ho dlouhodobě aktivovat.

8 Zdroje

- Ahmed, T., Nisler, C. R., Fluck, E. C., Walujkar, S., Sotomayor, M., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2022). Structure of the ancient TRPY1 channel from *Saccharomyces cerevisiae* reveals mechanisms of modulation by lipids and calcium. *Structure (London, England : 1993)*, 30(1), 139-155.e5. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2021.08.003>
- Al-Shawaf, E., Naylor, J., Taylor, H., Riches, K., Milligan, C. J., O'Regan, D., Porter, K. E., Li, J., & Beech, D. J. (2010). Short-term stimulation of calcium-permeable transient receptor potential canonical 5-containing channels by oxidized phospholipids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(7), 1453–1459. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.205666>
- Alawi, K. M., Russell, F. A., Aubdool, A. A., Srivastava, S., Riffo-Vasquez, Y., Baldissera, L., Thakore, P., Saleque, N., Fernandes, E. S., Walsh, D. A., & Brain, S. D. (2017). Transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) protects against pain and vascular inflammation in arthritis and joint inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(1), 252–260. <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2015-208886>
- Alcindor, T., & Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 18(1), 18–25. <https://doi.org/10.3747/CO.V18I1.708>
- Atmaca, A., Al-Batran, S. E., Werner, D., Pauligk, C., Güner, T., Koepke, A., Bernhard, H., Wenzel, T., Banat, A. G., Brueck, P., Caca, K., Prasnikař, N., Kullmann, F., Günther Derigs, H., Koenigsmann, M., Dingeldein, G., Neuhaus, T., & Jäger, E. (2013). A randomised multicentre phase II study with cisplatin/docetaxel vs oxaliplatin/docetaxel as first-line therapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 108(2), 265. <https://doi.org/10.1038/BJC.2012.555>
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J., & Patapoutian, A. (2004). Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron*, 41(6), 849–857. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00150-3)
- Baron, R., Tölle, T. R., Gockel, U., Brosz, M., & Freynhagen, R. (2009). A cross-sectional cohort survey in 2100 patients with painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: Differences in demographic data and sensory symptoms. *PAIN*, 146(1–2), 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2009.06.001>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.09.028>
- Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., & Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124(6), 1269–1282. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.023>
- Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S. E., & Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150), 204–208. <https://doi.org/10.1038/nature05910>
- Beech, D. J. (2012). Integration of transient receptor potential canonical channels with lipids. *Acta Physiologica*, 204(2), 227–237. <https://doi.org/10.1111/J.1748-1716.2011.02311.X>

- Bernal, L., Sotelo-Hitschfeld, P., König, C., Sinica, V., Wyatt, A., Winter, Z., Hein, A., Touska, F., Reinhardt, S., Tragl, A., Kusuda, R., Wartenberg, P., Sclaroff, A., Pfeifer, J. D., Ectors, F., Dahl, A., Freichel, M., Vlachova, V., Brauchi, S., ... Zimmermann, K. (2021). Odontoblast TRPC5 channels signal cold pain in teeth. *Science Advances*, 7(13).
<https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABF5567>
- Blair, N. T., Kaczmarek, J. S., & Clapham, D. E. (2009). Intracellular calcium strongly potentiates agonist-activated TRPC5 channels. *Journal of General Physiology*, 133(5), 525–546.
<https://doi.org/10.1085/JGP.200810153>
- Bröker-Lai, J., Kollwe, A., Schindeldecker, B., Pohle, J., Chi, V. N., Mathar, I., Guzman, R., Schwarz, Y., Lai, A., Weißgerber, P., Schwegler, H., Dietrich, A., Both, M., Sprengel, R., Draguhn, A., Köhr, G., Fakler, B., Flockerzi, V., Bruns, D., & Freichel, M. (2017). Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *The EMBO Journal*, 36(18), 2770–2789.
<https://doi.org/10.15252/EMBJ.201696369>
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., & Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 1999 398:6726, 398(6726), 436–441. <https://doi.org/10.1038/18906>
- 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* 1997 389:6653, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chen, X., Sooch, G., Demaree, I. S., White, F. A., & Obukhov, A. G. (2020). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. In *Cells* (Vol. 9, Issue 9). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9091983>
- Chukyo, A., Chiba, T., Kambe, T., Yamamoto, K., Kawakami, K., Taguchi, K., & Abe, K. (2018). Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. *Neuropeptides*, 67, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.12.002>
- Clark, J. I., Greene, J. B., Lau Clark, A., Dalal, J. S., & Hofmeister, C. C. (2013). Phase i pilot study of oxaliplatin, infusional 5-FU, and cetuximab in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Medical Oncology*, 30(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/S12032-012-0358-X/TABLES/3>
- Cui, N., Zhang, X., Tadepalli, J. S., Yu, L., Gai, H., Petit, J., Pamulapati, R. T., Jin, X., & Jiang, C. (2011). Involvement of TRP channels in the CO2 chemosensitivity of locus coeruleus neurons. *Journal of Neurophysiology*, 105(6), 2791. <https://doi.org/10.1152/JN.00759.2010>
- De Goeij, M., Van Eijk, L. T., Vanelderden, P., Wilder-Smith, O. H., Vissers, K. C., Van Der Hoeven, J. G., Kox, M., Scheffer, G. J., & Pickkers, P. (2013). Systemic Inflammation Decreases Pain Threshold in Humans In Vivo. *PLOS ONE*, 8(12), e84159.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084159>
- De March, Z., Giampà, C., Patassini, S., Bernardi, G., & Fusco, F. R. (2006). Cellular localization of TRPC5 in the substantia nigra of rat. *Neuroscience Letters*, 402(1–2), 35–39.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2006.03.061>
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., Lazdunski, M., Eschalier, A., Authier, N., & Bourinet, E. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Molecular Medicine*, 3(5), 266–278.
<https://doi.org/10.1002/EMMM.201100134>

- Deuis, J. R., Zimmermann, K., Romanovsky, A. A., Possani, L. D., Cabot, P. J., Lewis, R. J., & Vetter, I. (2013). An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain*, *154*(9), 1749. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.05.032>
- Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Failli, P., & Ghelardini, C. (2013). Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: could it correlate with in vivo neuropathy? *Free Radical Biology & Medicine*, *61*, 143–150. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.03.019>
- Dittert, I., Benedikt, J., Vyklický, L., Zimmermann, K., Reeh, P. W., & Vlachová, V. (2006). Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *Journal of Neuroscience Methods*, *151*(2), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.07.005>
- Du, S. L., Jia, Z. Q., Zhong, J. C., & Wang, L. F. (2021). TRPC5 in cardiovascular diseases. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, *22*(1), 127–135. <https://doi.org/10.31083/J.RCM.2021.01.212/RCM2020212/FIG1.JPG>
- Duan, J., Li, J., Chen, G. L., Ge, Y., Liu, J., Xie, K., Peng, X., Zhou, W., Zhong, J., Zhang, Y., Xu, J., Xue, C., Liang, B., Zhu, L., Liu, W., Zhang, C., Tian, X. L., Wang, J., Clapham, D. E., ... Zhang, J. (2019). Cryo-EM structure of TRPC5 at 2.8-Å resolution reveals unique and conserved structural elements essential for channel function. *Science Advances*, *5*(7), 7935–7959. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7935>
- El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., & Capiod, T. (2008). Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology*, *47*(6), 2068–2077. <https://doi.org/10.1002/HEP.22263>
- Erpelding, N., Moayedi, M., & Davis, K. D. (2012). Cortical thickness correlates of pain and temperature sensitivity. *Pain*, *153*(8), 1602–1609. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2012.03.012>
- Flemming, P. K., Dedman, A. M., Xu, S. Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C. D., Bateson, A. N., Muraki, K., & Beech, D. J. (2006). Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(8), 4977–4982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510301200>
- Gao, Y., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2016). TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature* *2016* *534*:7607, *534*(7607), 347–351. <https://doi.org/10.1038/nature17964>
- Gebremedhn, E. G., Shortland, P. J., & Mahns, D. A. (2018). The incidence of acute oxaliplatin-induced neuropathy and its impact on treatment in the first cycle: a systematic review. *BMC Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-018-4185-0>
- Goel, M., Sinkins, W. G., & Schilling, W. P. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(50), 48303–48310. <https://doi.org/10.1074/JBC.M207882200/ATTACHMENT/62116132-AC53-45A9-8F60-A6CC4B30B1D1/MMC1.PDF>
- Gomis, A., Soriano, S., Belmonte, C., & Viana, F. (2008). Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. *The Journal of Physiology*, *586*(Pt 23), 5633. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2008.161257>
- Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., & Clapham, D. E. (2003). TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nature Neuroscience* *2003* *6*:8, *6*(8), 837–845. <https://doi.org/10.1038/nn1092>

- Gross, S. A., Guzmán, G. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Zhu, M. X., Bruns, D., & Cavalié, A. (2009). TRPC5 is a Ca²⁺-activated channel functionally coupled to Ca²⁺-selective ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 34423–34432. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.018192/ATTACHMENT/40FD6F64-DC07-4EC0-BB34-159F67FC096A/MMC1.PDF>
- Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., & Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6408–6414. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06408.2002>
- Guo, W., Tang, Q., Wei, M., Kang, Y., Wu, J., X., & Chen, L. (2022). Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 channel regulation by their intracellular calcium-binding sites. *Neuron*, 110(6), 1023-1035.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2021.12.023>
- He, D. X., & Ma, X. (2016). Transient receptor potential channel C5 in cancer chemoresistance. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 37, Issue 1, pp. 19–24). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.109>
- He, Z., Jia, C., Feng, S., Zhou, K., Tai, Y., Bai, X., & Wang, Y. (2012). TRPC5 channel is the mediator of neurotrophin-3 in regulating dendritic growth via CaMKII α in rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 32(27), 9383–9395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6363-11.2012>
- Hong, C., Kwak, M., Myeong, J., Ha, K., Wie, J., Jeon, J. H., & So, I. (2015). Extracellular disulfide bridges stabilize TRPC5 dimerization, trafficking, and activity. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(4), 703–712. <https://doi.org/10.1007/S00424-014-1540-0/FIGURES/4>
- Hyllienmark, L., Jonsson, B., Ekberg, K., & Lindström, P. (2009). Abnormal cold perception in the lower limbs: A sensitive indicator for detection of polyneuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 85(3), 298–303. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2009.06.009>
- Im, D. S. (2005). Two ligands for a GPCR, proton vs lysolipid. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005 26:12, 26(12), 1435–1441. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00237.x>
- Johnstone, T. C., Suntharalingam, K., & Lippard, S. J. (2016). The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews*, 116(5), 3436. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.5B00597>
- Jung, S., Mühle, 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 *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3562–3571. <https://doi.org/10.1074/JBC.M211484200>
- Kang, L., Tian, Y., Xu, S., & Chen, H. (2021). Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment. In *Journal of Neurology* (Vol. 268, Issue 9, pp. 3269–3282). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09942-w>
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K. Y., Vennekens, R., Nilius, B., & Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1273. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0808487106>
- Kim, J., Ko, J., Myeong, J., Kwak, M., Hong, C., & So, I. (2019). TRPC1 as a negative regulator for TRPC4 and TRPC5 channels. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 471(8), 1045–1053. <https://doi.org/10.1007/S00424-019-02289-W/FIGURES/3>

- Klit, H., Finnerup, N. B., Andersen, G., & Jensen, T. S. (2011). Central poststroke pain: A population-based study. *PAIN®*, *152*(4), 818–824. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2010.12.030>
- Lee, K. P., Choi, S., Hong, J. H., Ahuja, M., Graham, S., Ma, R., So, I., Shin, D. M., Muallem, S., & Yuan, J. P. (2014). Molecular determinants mediating gating of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(10), 6372–6382. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.546556>
- Lee, K. P., Yuan, J. P., So, I., Worley, P. F., & Muallem, S. (2010). STIM1-dependent and STIM1-independent function of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(49), 38666–38673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155036>
- Leitão, E., Schröder, C., Parenti, I., Dalle, C., Rastetter, A., Kühnel, T., Kuechler, A., Kaya, S., Gérard, B., Schaefer, E., Nava, C., Drouot, N., Engel, C., Piard, J., Duban-Bedu, B., Villard, L., Stegmann, A. P. A., Vanhoutte, E. K., Verdonshot, J. A. ., ... Depienne, C. (2022). Systematic analysis and prediction of genes associated with disorders on chromosome X. *MedRxiv*, *13*, 2022.02.16.22270779. <https://doi.org/10.1101/2022.02.16.22270779>
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, *450*(7168), 376–382. <https://doi.org/10.1038/nature06265>
- Loprinzi, C. L., Lacchetti, C., Bleeker, J., Cavaletti, G., Chauhan, C., Hertz, D. L., Kelley, M. R., Lavino, A., Lustberg, M. B., Paice, J. A., Schneider, B. P., Lavoie Smith, E. M., Smith, M. Lou, Smith, T. J., Wagner-Johnston, N., & Hershman, D. L. (2020). Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: ASCO guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, *38*(28), 3325–3348. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01399>
- Ma, X., Chen, Z., Hua, D., He, D., Wang, L., Zhang, P., Wang, J., Cai, Y., Gao, C., Zhang, X., Zhang, F., Wang, T., Hong, T., Jin, L., Qi, X., Chen, S., Gu, X., Yang, D., Pan, Q., ... Yao, X. (2014). Essential role for TrpC5-containing extracellular vesicles in breast cancer with chemotherapeutic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(17), 6389–6394. https://doi.org/10.1073/PNAS.1400272111/SUPPL_FILE/PNAS.201400272SI.PDF
- MacDonald, D. I., Luiz, A. P., Iseppon, F., Millet, Q., Emery, E. C., & Wood, J. N. (2021). Silent cold-sensing neurons contribute to cold allodynia in neuropathic pain. *Brain*, *144*(6), 1711. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAB086>
- MacDonald, D. I., Wood, J. N., & Emery, E. C. (2020). Molecular mechanisms of cold pain. *Neurobiology of Pain*, *7*, 100044. <https://doi.org/10.1016/J.YNPAI.2020.100044>
- McKemy, D. D. (2012). The Molecular and Cellular Basis of Cold Sensation. *ACS Chemical Neuroscience*, *4*(2), 238–247. <https://doi.org/10.1021/CN300193H>
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* *2002* *416*:6876, *416*(6876), 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
- Miyake, T., Nakamura, S., Meng, Z., Hamano, S., Inoue, K., Numata, T., Takahashi, N., Nagayasu, K., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2017). Distinct Mechanism of Cysteine Oxidation-Dependent Activation and Cold Sensitization of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel by High and Low Oxaliplatin. *Frontiers in Physiology*, *8*(NOV), 878. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00878>

- Miyano, K., Shiraishi, S., Minami, K., Sudo, Y., Suzuki, M., Yokoyama, T., Terawaki, K., Nonaka, M., Murata, H., Higami, Y., & Uezono, Y. (2019). Carboplatin enhances the activity of human transient receptor potential ankyrin 1 through the cyclic AMP-protein kinase A-kinase anchoring protein (AKAP) pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133271>
- Moparthy, L., Kichko, T. I., Eberhardt, M., Högestätt, E. D., Kjellbom, P., Johanson, U., Reeh, P. W., Leffler, A., Filipovic, M. R., & Zygmunt, P. M. (2016). Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Scientific Reports* *2016 6:1*, *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28763>
- Myeong, J., Ko, J., Hong, C., Yang, D., Lee, K. P., Jeon, J. H., & So, I. (2016). The interaction domains of transient receptor potential canonical (TRPC)1/4 and TRPC1/5 heteromultimeric channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *474*(3), 476–481. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.04.138>
- Nadezhdin, K. D., Neuberger, A., Trofimov, Y. A., Krylov, N. A., Sinica, V., Kupko, N., Vlachova, V., Zakharian, E., Efremov, R. G., & Sobolevsky, A. I. (2021). Structural mechanism of heat-induced opening of a temperature-sensitive TRP channel. *Nature Structural & Molecular Biology* *2021 28:7*, *28*(7), 564–572. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00615-4>
- Nassini, R., Gees, M., Harrison, S., De Siena, G., Materazzi, S., Moretto, N., Failli, P., Preti, D., Marchetti, N., Cavazzini, A., Mancini, F., Pedretti, P., Nilius, B., Patacchini, R., & Geppetti, P. (2011). Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain*, *152*(7), 1621–1631. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2011.02.051>
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. In *Genome Biology* (Vol. 12, Issue 3, pp. 1–11). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
- Ningoo, M., Plant, L. D., Greka, A., & Logothetis, D. E. (2021). PIP2 regulation of TRPC5 channel activation and desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, *296*. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100726>
- Obukhov, A. G., & Nowycky, M. C. (2004). TRPC5 Activation Kinetics Are Modulated by the Scaffolding Protein Ezrin/Radixin/Moesin-Binding Phosphoprotein-50 (EBP50). *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, *201*, 227–235. <https://doi.org/10.1002/jcp.20057>
- Obukhov, A. G., & Nowycky, M. C. (2005). A Cytosolic Residue Mediates Mg²⁺ Block and Regulates Inward Current Amplitude of a Transient Receptor Potential Channel. *The Journal of Neuroscience*, *25*(5), 1234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4451-04.2005>
- Obukhov, A. G., & Nowycky, M. C. (2008). TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle. *Journal of Cellular Physiology*, *216*(1), 162–171. <https://doi.org/10.1002/jcp.21388>
- Ogihara, T., Nakagawa, T., Hayashi, M., Koyanagi, M., Yonezawa, A., Omura, T., Nakagawa, S., Kitada, N., Imai, S., & Matsubara, K. (2019). Improvement of peripheral vascular impairment by a phosphodiesterase type 5 inhibitor tadalafil prevents oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, *141*(4), 131–138. <https://doi.org/10.1016/J.JPHS.2019.10.005>
- Oun, R., Moussa, Y. E., & Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, *47*(19), 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>

- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., & Nilius, B. (2006). Permeation and selectivity of TRP channels. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 68, Issue 1, pp. 685–717). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
- Pachman, D. R., Qin, R., Seisler, D. K., Smith, E. M. L., Beutler, A. S., Ta, L. E., Lafky, J. M., Wagner-Johnston, N. D., Ruddy, K. J., Dakhil, S., Staff, N. P., Grothey, A., & Loprinzi, C. L. (2015). Clinical Course of Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Results From the Randomized Phase III Trial N08CB (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*, *33*(30), 3416. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.8533>
- Park, S. E., Song, J. H., Hong, C., Kim, D. E., Sul, J. W., Kim, T. Y., Seo, B. R., So, I., Kim, S. Y., Bae, D. J., Park, M. H., Lim, H. M., Baek, I. J., Riccio, A., Lee, J. Y., Shim, W. H., Park, B., Koh, J. Y., & Hwang, J. J. (2019). Contribution of Zinc-Dependent Delayed Calcium Influx via TRPC5 in Oxidative Neuronal Death and its Prevention by Novel TRPC Antagonist. *Molecular Neurobiology*, *56*(4), 2822–2835. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1258-7>
- 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*(5), 705–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/JCC.20289>
- Potenzieri, A., Riva, B., & Genazzani, A. A. (2020). Unexpected Ca²⁺-mobilization of oxaliplatin via H1 histamine receptors. *Cell Calcium*, *86*, 102128. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2019.102128>
- Riccio, A., Li, Y., Moon, J., Kim, K. S., Smith, K. S., Rudolph, U., Gapon, S., Yao, G. L., Tsvetkov, E., Rodig, S. J., Van't Veer, A., Meloni, E. G., Carlezon, W. A., Bolshakov, V. Y., & Clapham, D. E. (2009). Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell*, *137*(4), 761. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.03.039>
- Rimola, V., Hahnefeld, L., Zhao, J., Jiang, C., Angioni, C., Schreiber, Y., Osthues, T., Pierre, S., Geisslinger, G., Ji, R. R., Scholich, K., & Sisignano, M. (2020). Lysophospholipids Contribute to Oxaliplatin-Induced Acute Peripheral Pain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *40*(49), 9519–9532. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1223-20.2020>
- Rimola, V., Osthues, T., Königs, V., Geißlinger, G., & Sisignano, M. (2021). Oxaliplatin Causes Transient Changes in TRPM8 Channel Activity. *International Journal of Molecular Sciences* *2021*, Vol. 22, Page 4962, *22*(9), 4962. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094962>
- Riva, B., Dionisi, M., Potenzieri, A., Chiorazzi, A., Cordero-Sanchez, C., Rigolio, R., Carozzi, V. A., Lim, D., Cavaletti, G., Marmiroli, P., Distasi, C., & Genazzani, A. A. (2018). Oxaliplatin induces pH acidification in dorsal root ganglia neurons. *Scientific Reports*, *8*(1), 15084. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33508-6>
- Sadler, K. E., Moehring, F., Shiers, S. I., Laskowski, L. J., Mikesell, A. R., Plautz, Z. R., Brezinski, A. N., Mecca, C. M., Dussor, G., Price, T. J., McCorvy, J. D., & Stucky, C. L. (2021). Transient receptor potential canonical 5 mediates inflammatory mechanical and spontaneous pain in mice. *Science Translational Medicine*, *13*(595). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd7702>
- Sakurai, M., Egashira, N., Kawashiri, T., Yano, T., Ikesue, H., & Oishi, R. (2009). Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: Involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *PAIN®*, *147*(1–3), 165–174. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2009.09.003>

- Salat, K. (2020). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1—current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy. In *Pharmacological Reports* (Vol. 72, Issue 3, pp. 486–507). Springer. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00109-y>
- Salido, G. M., Sage, S. O., & Rosado, J. A. (2009). TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(2), 223–230. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2008.11.001>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17517–17526. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.23.17517>
- Schaldecker, T., Kim, S., Tarabanis, C., Tian, D., Hakrrouch, S., Castonguay, P., Ahn, W., Wallentin, H., Heid, H., Hopkins, C. R., Lindsley, C. W., Riccio, A., Buvall, L., Weins, A., & Greka, A. (2013). Inhibition of the TRPC5 ion channel protects the kidney filter. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(12), 5298. <https://doi.org/10.1172/JCI711165>
- Schmitt, L. I., Leo, M., Kleinschnitz, C., & Hagenacker, T. (2018). Oxaliplatin Modulates the Characteristics of Voltage-Gated Calcium Channels and Action Potentials in Small Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats. *Molecular Neurobiology*, 55(12), 8842–8855. <https://doi.org/10.1007/S12035-018-1029-5/FIGURES/8>
- Song, K., Wei, M., Guo, W., Quan, L., Kang, Y., Wu, J. X., & Chen, L. (2021). Structural basis for human trpc5 channel inhibition by two distinct inhibitors. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.63429>
- Starobova, H., & Vetter, I. (2017). Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 174. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00174>
- Stoetzer, C., Papenberg, B., Doll, T., Völker, M., Heineke, J., Stoetzer, M., Wegner, F., & Leffler, A. (2016). Differential inhibition of cardiac and neuronal Na⁽⁺⁾ channels by the selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors duloxetine and venlafaxine. *European Journal of Pharmacology*, 783, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2016.04.051>
- Storch, U., Forst, A. L., Pardatscher, F., Erdogmus, S., Philipp, M., Gregoritz, M., Schnitzler, M. M. y., & Gudermann, T. (2017). Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(1), E37–E46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612263114>
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*, 112(6), 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2)
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (2001). TRPC1 and TRPC5 Form a Novel Cation Channel in Mammalian Brain. *Neuron*, 29(3), 645–655. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00240-9)
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 39014–39019. <https://doi.org/10.1074/JBC.M306705200/ATTACHMENT/C10F74EF-8810-45F5-83C5-6856FE327792/MMC1.PDF>

- Sukumar, P., & Beech, D. J. (2010). Stimulation of TRPC5 cationic channels by low micromolar concentrations of lead ions (Pb²⁺). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(1), 50–54. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.01.074>
- Tan, C. H., & McNaughton, P. A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature*, 536(7617), 460–463. <https://doi.org/10.1038/NATURE19074>
- Taylor, K. S., Anastakis, D. J., & Davis, K. D. (2010). Chronic pain and sensorimotor deficits following peripheral nerve injury. *PAIN®*, 151(3), 582–591. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2010.06.032>
- Toda, T., Yamamoto, S., Umehara, N., Mori, Y., Wakamori, M., & Shimizu, S. (2019). Protective Effects of Duloxetine against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Transient Receptor Potential Melastatin 2 Inhibition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(2), 246–254. <https://doi.org/10.1124/JPET.118.253922>
- 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(3), 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4)
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 387. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142819>
- Vriens, J., Nilius, B., & Voets, T. (2014). Peripheral thermosensation in mammals. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 15, Issue 9, pp. 573–589). <https://doi.org/10.1038/nrn3784>
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S. E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., Oberwinkler, J., Vennekens, R., Gudermann, T., Nilius, B., & Voets, T. (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron*, 70(3), 482–494. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.051>
- Wei, G., Gu, Z., Gu, J., Yu, J., Huang, X., Qin, F., Li, L., Ding, R., & Huo, J. (2021). Platinum accumulation in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System : JPNS*, 26(1), 35–42. <https://doi.org/10.1111/JNS.12432>
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, 39(35), 8113–8127. <https://doi.org/10.1039/C0DT00292E>
- Winchester, W. J., Gore, K., Glatt, S., Petit, W., Gardiner, J. C., Conlon, K., Postlethwaite, M., Saintot, P. P., Roberts, S., Gosset, J. R., Matsuura, T., Andrews, M. D., Glossop, P. A., Palmer, M. J., Clear, N., Collins, S., Beaumont, K., & Reynolds, D. S. (2014). Inhibition of TRPM8 channels reduces pain in the cold pressor test in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 351(2), 259–269. <https://doi.org/10.1124/JPET.114.216010>
- Wright, D. J., Simmons, K. J., Johnson, R. M., Beech, D. J., Muench, S. P., & Bon, R. S. (2020). Human TRPC5 structures reveal interaction of a xanthine-based TRPC1/4/5 inhibitor with a conserved lipid binding site. *Communications Biology* 2020 3:1, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01437-8>
- Wu, B., Su, X., Zhang, W., Zhang, Y. H., Feng, X., Ji, Y. H., & Tan, Z. Y. (2021). Oxaliplatin Depolarizes the IB4– Dorsal Root Ganglion Neurons to Drive the Development of Neuropathic Pain Through TRPM8 in Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 108. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2021.690858/BIBTEX>
- Xiao, B., Coste, B., Mathur, J., & Patapoutian, A. (2011). Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca²⁺ influx and modulates gene expression. *Nature Chemical Biology*, 7(6), 351–358. <https://doi.org/10.1038/nchembio.558>

- 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*(6894), 181–186. <https://doi.org/10.1038/NATURE00882>
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., & Mori, Y. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology*, *2*(11), 596–607. <https://doi.org/10.1038/nchembio821>
- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A., & Catterall, W. A. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews*, *57*(4), 387–395. <https://doi.org/10.1124/PR.57.4.13>
- Zeng, F., Xu, S. Z., Jackson, P. K., McHugh, D., Kumar, B., Fountain, S. J., & Beech, D. J. (2004). Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell. *The Journal of Physiology*, *559*(Pt 3), 739. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2004.065391>
- Zheng, J. (2013). Molecular mechanism of TRP channels. *Comprehensive Physiology*, *3*(1), 221–242. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120001>
- Zhu, M. H., Chae, M., Kim, H. J., Lee, Y. M., Kim, M. J., Jin, N. G., Yang, D. K., So, I., & Kim, K. W. (2005). Desensitization of canonical transient receptor potential channel 5 by protein kinase C. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *289*(3 58-3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00440.2004>
- Zimmermann, K., Deuis, J. R., Inserra, M. C., Collins, L. S., Namer, B., Cabot, P. J., Reeh, P. W., Lewis, R. J., & Vetter, I. (2013). Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia. *PAIN®*, *154*(10), 1999–2006. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.06.015>
- Zimmermann, K., Lennerz, J. K., Hein, A., Link, A. S., Stefan Kaczmarek, J., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J. D., Riccio, A., & Clapham, D. E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(44), 18114–18119. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115387108>
- Zimova, L., Ptakova, A., Mitro, M., Krusek, J., & Vlachova, V. (2022). Activity dependent inhibition of TRPC1/4/5 channels by duloxetine involves voltage sensor-like domain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *152*, 113262. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113262>

Příloha 1

Ptakova, A., Mitro, M., Zimova, L., & Vlachova, V. (2022). Cellular context determines primary characteristics of human TRPC5 as a cold-activated channel. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/JCP.30821>