

Neurální a buněčné procesy smyslové transdukce – jak smyslové podněty vstupují do nervového systému.

Svět smyslů je fascinující. Informuje nás o okolí. Dává nám udělat si představu o světě. Dává také hodnotu životu, zrak, hudba.

Tato přednáška by chtěla rozšířit vaše poznatky o receptorech, buněčné signalizaci, kanálech a je jakýmsi úvodem k některým kapitolám z neurofyziologie.

Dráhy, které mají vztah k iontovým kanálům. Udělat si pořádek ve vztahu buněčná signalizace a membránového potenciálu. Co se děje na membránách, při dopadu chemického nebo fyzikálního signálu, který má smyslovou povahu.

Předávání signálů patří mezi základní vlastnosti života. Jak rozdělit signály na smyslové a ne-smyslové? Podle představy o 5 základních smyslech, jsou to zřejmě ty z vnějšího prostředí, které vyvolají celkem bezprostředně po styku s membránou potřebnou změnu membránového napětí a vstoupí do CNS. Otázka je, jestli brát i ty ze vnitřku a ty, které se vyhnou vědomí.

Jsou rychlejší než metabotropní signalizace a vždy končí na kanálech. Využívají podobné dráhy.

Schopnost organismů rozpoznávat i nepatrné změny vnějšího a vnitřního prostředí a reagovat na ně v případě ohrožení je jednou z nejdůležitějších podmínek zachování života. Sensorický systém, který tuto úlohu zajišťuje, je vybaven přesnými a důmyslnými mechanismy, které umožňují rozeznat podněty různých modalit, odlišit nebezpečné a život ohrožující od neškodných a předat informaci o nich do centrálního nervového systému. Tato schopnost je dána zejména specifickými vlastnostmi iontových kanálů, které jsou exprimovány na periferních zakončeních primárních sensorických neuronů. Podle typu a intenzity podnětu jsou aktivovány specifické receptory-iontové kanály, jejichž otevření umožní průtok kladně nabitých iontů do nitra buňky, což vede k depolarizaci buněčné membrány a vzniku impulzní aktivity, která je dále přenášena do centrálního nervového systému.

Molekulární fyziologie smyslové transdukce je postavena na studiu kanálů a jejich vlastností.

Kanály i v jiných souvislostech než nervové funkce – svalový stah, celá Ca signalizace, osmotická a pH rovnováha, poruchy – srdce, cystická fibróza.

V této přednášce se soustředíme na procesy na molekulární úrovni. Pomineme, jak se signál k receptoru dostal, jakými strukturami byl zesílen nebo zpracován. Pomineme také jeho další zpracování v nervové soustavě, které je ovšem ve skutečnosti snad ještě důležitější než zachycení signálu na receptoru. To vše bude čas zmínit v samostatné přednášce. Dnes nám půjde o to, abychom si ukázali na zajímavé paralely mezi drahami buněčné signalizace, jak je znáte z jiných přednášek týkajících se diferenciaci nebo buněčné smrti aj. a drahami, které zprostředkují vstupy podnětů. Zjistíme překvapivé paralely.

Fotorecepce – transdukce světelného kvanta na elektrický potenciál.

Fototransdukce, proces, kterým je energie světla konvertována na fotoreceptorovou elektrickou odpověď byl dlouho v popředí výzkumu, nejen kvůli důležitosti smyslu, ale i pro obecné mechanismy přenosu signálu. První studie v 70. a 80. letech odhalily biochemické kroky excitace v obratlovčí tyčince a dohromady se studii o hormonálně stimulované adenylát cykláze vedly k objevu a charakterizaci G-proteinového signálování. Tyto kaskády

kdekoliv heptahelikální transmembránové receptory jako rhodopsin katalyticky aktivují heterotrimerní G proteiny, jsou často nalézány nejen v mnoha sensorických receptorech, ale v celém těle, kde odpovídají na všechny typy chemických messengerů jako jsou hormony, neurotransmittery, látky nesoucí vůně nebo chutě.

Jedním z charakteristických znaků takových kaskád je jejich schopnost zesílení. Potvrdily se původní hypotéza vysoké citlivosti, že kvantované skoky v elektrické aktivitě receptorových buněk odpovídají na absorpci jediného fotonu světla.

Jiným funkčním atributem sdíleným jak obratlovci tak bezobratlými je nízký šum ve tmě – spontánní termální izomerizace rhodopsinu, která nastavuje limit absolutní citlivosti. Dále účinné mechanismy ukončení odpovědi na světlo nebo schopnost adaptovat se na obrovský rozsah intenzit.

Ale jsou také rozdíly mezi obratlovci a řekněme nejvíce zkoumaným muším způsobem molekulární fototransdukce. Zaprvé obratlovčí fotoreceptory hyperpolarizují, jelikož se kationtové kanály uzavírají v odpověď na světlo. U většiny bezobratlých však depolarizují, protože je světlo otevírá. Za další, hledání kompromisu mezi zesílením a rychlostí odpovědi vedlo k časovému rozlišení lidského oka na hranici asi 10Hz. U muších fotoreceptorů byla popsána nejrychlejší známá G-proteinem zprostředkovaná signální dráha odpovídající 10 krát rychleji. Hmyz má navzdory obrovské citlivosti lepší schopnost adaptovat se v celém rozsahu 10^6 absorbovaných fotonů za sec.

Fototransdukční kaskáda je známa do velkých detailů a v učebnicích ji najdeme jako příklad G-proteinové signálování. Proti tomu molekulární strategie umožňující fototransdukci bezobratlých jsou stále jen předmětem dohadů.

Fototransdukce začíná absorpcí světla rhodopsinem, čímž se spustí fotoisomerizaci 11 cis na all trans chromoforu a formaci aktivovaného stavu metarhodopsinu. U obratlovců all trans retinal následně disociuje a musí být reisomerizován cestou zdlouhavé enzymatické dráhy, která určuje čas temnostní fáze, která následuje po „vypálení“ světlem (asi 30min pro tyčinky). Rhodopsin bezobratlých může být přímo reizomerizován zpět na rhodopsin absorpcí světla delší vlnové délky. Právě takové světlo prochází červeně zbarvenými očima hmyzu a dovoluje nepřetržitou zpětnou konverzi na rhodopsin.

Bezobratlí užívají fosfoinozitolovou dráhu OBR

V obratlovcích tyčinkách heterotrimerní G protein transducin aktivuje fosfodiesterázu (PDE) což vede k hydrolýze cGMP a uzavření transdukčních kanálů. U *Drosophily* rhodopsin aktivuje jinou izoformu G-proteinu, která aktivuje, místo PDE izoformu fosfolipázy C PLC (kódovanou *norpA* genem). To prostřednictvím polynenasycených mastných kyselin (PUFA) jako je arachidonová kyselina, vede k otevírání dvou tříd Ca světlosensitivních kanálů TRP a TRP-like. S četnými mutacemi na 20 klonovaných genech *Drosophilí* fototransdukce představuje nejlepší genetický model této všudypřítomné CA signální dráhy mezi vyššími eukaryoty.

V každé transdukční kaskádě je třeba aby každá komponenta byla účinně inaktivována. Nefunguje-li to, jako u mutantů, vede to k dlouho trvajícím odpovědím, snižujícím časové rozlišení. Bežným prvkem G proteinového signálování je, že receptor je inaktivován vazbou na arestin. Aktivita G proteinu je ukončena GTPázovou aktivitou G proteinu. Ale jeho vlastní aktivita je příliš pomalá a tak je nutná vazba na efektorový enzym samotný (PDE u tyčinek, PLC u much) aby se urychlila hydrolýza GTP. Má to elegantní logiku v tom, že G protein nebude inaktivován dříve dokud nepotká a neaktivuje svůj down stream následný efektor. Naposled je třeba inaktivovat kanály, to je u obratlovců resyntézou cGMP guanylát cyklázou. Řízení tohoto enzymu Ca dependentní zpětnou vazbou je jedním z hlavních mechanismů adaptace na světlo.

Kanály

Transdukční kanály mají centrální roli jak u obratlovců, tak u bezobratlých. Kromě toho, že působí elektrickou odpověď, jsou propustné pro Ca, což je klíčový mediátor ukončení odpovědi a adaptace.

Objev, že transdukční kanály obratlovců byly vrátkovány cGMP na inside-out kouscích byly zásadním argumentem v dlouhotrvající debatě o identitě druhého posla obratlovců fototransdukce. Byly klonovány a definovaly novou kanálovou rodinu se 6 transmembránovými doménami. Podobné nacházíme v řadě nervových i nenervových tkání, včetně čichových receptorů.

Asi nejdůležitější vlastností je vysoká Ca propustnost. Ca neustále přitéká, ale je Na/K/Na výměníkem vyčerpáváno. Jak se kanál zavírá v odpověď na světlo, Ca je stále vyčerpáváno a jeho redukce je zásadním signálem pro terminaci odpovědi a zprostředkuje adaptaci.

TRP kanály

V kontrastu s obratlovcem, fotoreceptory *Drosophily* exprimují přinejmenším dva různé kanály TRP a TRPL. Ačkoli nejsou příbuzné obratlovcům, mají podobné vlastnosti.

Difuze versus signálové komplexy

Amplifikace u tyčinek je pokládána za důsledek následných náhodných difúzních setkání. Rhodospin nejprve aktivuje několik stovek transducinových molekul během chaotického pohybu v diskové membráně. Aktivovaná alfa podjednotka transducinu potom bezprostředně se naváže a aktivuje PDE molekuly. Katalytická výkonnost PDE je mezi nejvyššími známými z enzymů a je limitována pouze přísunem cGMP.

Difúzní model byl dlouho vlivným konceptem intracelulárního signálování. Ale jak je tento model chaoticky interagujících proteinů obecný v signálové transdukci? Předpokládá se dnes, že receptory, enzymy a kanály místo toho jsou organizovány do multimolekulárních signalizačních komplexů. Shromážděním elementů ve specifické subcelulární lokalitě může zvýšit rychlost a specifitu odpovědi.

Některé klíčové elementy *Drosophilí* fotorecepční kaskády jsou shromážděny do multiceulárního komplexu ohrazujícím (jako lešením) INAD proteinem s 5 doménami. Obr. 19.1 ukazuje, jak komplex transducinů nebo signalplex organizuje všechny části signální kaskády. Klíčové komponenty: TRP kanál, PLC fosfolipáza C a PKC tvoří jádro makromolekulárního komplexu individuální vazbou na domény INAD a udržuje správnou lokalizaci v mikrovilech.

Obovská míra adaptace je stále nejasná. Avšak ví se, že existuje neobyčejná schopnost TRPL cestovat translokovat se v rhabdomerách v závislosti na intenzitě osvětlení a tak adaptovat míru transdukce. Spolu s ním cestuje podjednotka G proteinu. Po jedné hodině jsou hlavně v těle sítnicové buňky. Návrat je ještě rychlejší. Aktin myosin spolupráce.

Kalciové signálování má v *Drosophile* výborný model.

Chemorecepce

Tento pozoruhodný, chemicko-detekční systém schopný rozeznávat tisíce nízkomolekulárních organických látek se vyvíjel po celou dobu existence života. Jeho studium nejprve ve stínu studia fotorecepce, ale v posledních dekádách odhalilo smyslové a signální mechanismy platné i v jiných oblastech mozku a tkání.

Mezi vyššími eukaryoty od much po savce existuje překvapivá evoluční konvergence udržující konzervativní organizaci signální dráhy čichového systému. *Drosophilí* systém je podobný obratlovcům v tom, že každý sensorický neuron exprimuje pouze jeden typ receptoru. Ale o tom jindy.

Před deseti lety objev a popis rodiny savčích receptorů přinesl jednu předvídanou a jednu neočekávanou informaci: OR čichové receptory jsou podobné těm, které známe u

neurotransmise nebo u fotorecepce a mnoha dalších buněčných procesů. Neočekávané bylo to, že v savčím genomu je asi 1000 genů pro čichové receptory, což z ní dělá patrně největší genovou rodinu v celém genomu. 3% našich genů jsou věnovány čichovým receptorům.

OBR hypervariabilní oblasti, kde se sekvence odlišují ve 3.4. a 5. transmembránové oblasti. Kapsa asi ve třetině receptoru – je asi vazebným místem pro ligand. Podobá se místu pro retinal o rhodopsinu.

Jak se na receptor naváže chemická molekula, je spuštěna kaskáda událostí, které transformuje energii chemické vazby do nervového signálu.

OBR Aktivace G proteinu vede k aktivaci adenyl cyklázy. Ta konvertuje z nadbytku intracelulární ATP na cAMP – molekulu s mnoha signálními rolemi v buňkách. V případě čichu se váže na intracelulární stranu iontového kanálu – velmi příbuzného fotorecepčním a vtok kationtů je umožněn. Známe

Cl efflux pomáhá depolarizovat buňku - je to adaptace na to, že cilie tkví v hlenu mimo tělo, kde koncentrace iontů už nejsou tak dobře regulovány jako v intersticiálních kompartmentech.

Ca také vtéká a v negativně zpětnovazebném cyklu snižuje citlivost kanálu k cAMP. To vede k velice strmé křivce koncentrace – odpověď. Vysoká citlivost pro slabé koncentrace, ale široká škála bez saturace.

Co jsem se dozvěděli z výzkumu čichu a proč Nobelova cena? 2004 Linda Buck a Richard Axel. Je to povzbuzení pro základní výzkum, protože není žádná praktická aplikace pro jejich výzkumy. Nicméně polovina léků působí před G proteinové receptory různých typů.

Chuť

Není na zemi živočicha, který by opomenul chemickou kontrolu toho, co požívá. Lidské dítě několik dní staré rozlišuje sladké a hořké.

Opět receptorové proteiny jsou na membráně mikrovilů, naslouchající jako antény chemickému prostředí. Transdukční kaskáda je spuštěna navázáním chuťové molekuly na receptor.

Dvě chuťové kvality informují ionty v ústní dutině – slano a kyselo.

Slano – hlídá NaCl a další minerály nutné k životu. OBR Receptor ENaC citlivý na aldosteron. Indukce více kanálů. Je ironií, že víme málo.

Kyselo – nezralé, zkažené. Dva typy receptorů: kanál, který vede vtok protonů. Jiný typ H vrátkovaný kanál.

Hořko – varuje před nebezpečím.

Sladko – vysoce kalorický přísun. Velké úsilí chemiků a vědců z potravinářského průmyslu přijít na sladký receptor. Až genetika a molekulární biologie.

Umami – masitá chuť bohatá na proteiny.

Mechanorecepce

Mechanické síly přinášejí zvnějšku důležité informace o prostředí – sluch, hmat, rovnováha, zrychlení. Podobně i vnitřním, ale to už jsme u bolesti nebo propriorecepce, kterou jsme si vyřadili.

Mezi ostatními smysly mechanorecepce vyniká rychlostí a citlivostí. Opakujícím se motivem různých mechanismů je převedení mechanické síly na specifické iontové kanály, které se rychle otevrou a zesílí signál díky průniku mnoha iontů. Mechanické síly mohou také ovlivnit intracelulární pochody v buňce – jako je genová transkripce – prostřednictvím cytoskeletu, ale to už není typický mechanismus rychlé mechanické percepce.

Požadovaná rychlost implikuje, že použití druhých poslů není možné. Požadavek citlivosti zase diktuje maximum energie přímo přenesené na kanál. To je umožněno kanálem detekujícím relativní posun mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím jako je cytoskelet. Vnější anténa a cytoskeletární kotva jsou strukturami napojenými na kanál. Ten pak mění pravděpodobnost otevření podle tahu. OBR

Z tohoto obecného schématu pak lze odvodit řadu dalších pozoruhodných vlastností např. sluchu pomocí vláskových buněk, kde jsou hlavní přednosti mechanorecepce dovedeny k dokonalosti. Jde zejména o schopnost adaptace na trvalou tenzi. Nastavení citlivosti k malým změnám na pozadí trvalého napětí. Nebo aktivní zesílení nepatrných vibrací.

Nejnámějšími se staly mechanoreceptivní kanály bakterií *Escherichia*, kde jde spíše o regulaci osmolality, pak háďátka *Caenorhabditis* a *Drosophila*. OBR

Mutanti byli defektivní pro dotyk. Podobně i mutanti *drosophil*. Larvy, které nebyly citlivé na dotek, byly v dospělosti hluchými mouchami s nekoordinovanými pohyby. Princip je zřejmě dosti konzervovaný a obecný pro různé aplikace mechanorecepce. Mutace se týkaly kotev na jedné nebo druhé straně membrány nebo kanálu samotného. Kanál opět patří do rodiny TRP.

Podobné je to s vláskovými buňkami lidského ucha, které mají patrně s *drosophil*mi společného předka.

Bolest.

Chrání nás před hrozcím zraněním a spouští obranné odpovědi. Může ovšem přerůst svou užitečností a stává se otupující a ve chronické fázi se stává ohrožení sama.

Nociceptory

Všechny sensorické systémy musí konvertovat environmentální stimuly na elektrochemické signály. V případě zraku nebo čichu potřebují primární neurony jediný druh stimulu. Nocicepce je jiná v tom, že primární neurony dráhy bolesti mají schopnost detekovat širokou škálu modalit včetně chemické a fyzikální povahy. Musí být tedy vybavena rozmanitým repertoárem transdukčních zařízení. Na rozdíl od zraku chuti nebo čichu nejsou nervová zakončení pro bolest lokalizována v nějaké anatomické struktuře, ale jsou rozptýlena po celém těle, v kůži, svalech, kloubech vnitřních orgánech. Jsou různé typy vláken, o kterých se předpokládá, že vedou různou rychlostí a zprostředkovávají akutní, ostrou prudkou bolest a jiná difuzní, pozdní bolest tupou.

Receptory jsou obvykle polymodální, odpovídající jak na teplotu, tak na mechanické stimuly a na poranění tkáně. Odpověď na horko je jednou z nejprostupovanějších bolestivých odpovědí. Je pozoruhodné, že mnoho funkčních charakteristik nociceptorů zůstává zachováno i když jsou sensorická ganglia vypreparována a dána do kultury. Tak je možné studovat teplotní odpovědi různých typů neuronů. OBR. Jaký je molekulární transdukční mechanismus?. V případě mírné teploty nocicepce pomocí C aferentace byl přenašeč objeven klonováním a funkční charakteristikou vaniloidního receptoru TRP VR1 OBR 2b. Ten je aktivován kapsaicinem (pálivou substancí z chili papriček) a dalšími vaniloidními látkami. TRP VR1 je neselektivní, kationtový kanál mající velmi strmou teplotní závislost a prahem 43°C. Tím se podobá horkem drážděným neuronům měřícím teplotu. Zdá se, že citlivost na horko a kapsaicin se vážou na společný základ, mají stejný přenašeč.

Nociceptory mohou být ovlivněny mechanicky, tlakem, deformací, napětím nebo změnou osmolality. Je to ENaC/DEG rodina tvořící mechanicky sensitivní přenašeč. Mechanicky vrátkované kanály známe již od bakterií, háďátka nebo *drosophily*. Otázkou je jestli neexistují mechanochemické procesy, kde napětí by uvolňovalo difuzibilní messenger, který by dráždil neurony. Extracelulární ATP by mohlo být tímto poslem. Na žabích oocytech

bylo vyzkoušeno, že mechanická stimulace vede k uvolňování ATP z buňky, což vede k autokrinní aktivaci receptorů buněčného povrchu.

Mutantní myši VR1 -/- a jejich pozměněné teplotně sensitivní chování na horké podložce prozradily mnohé o funkcích kanálů. OBR ?

Protože řada kanálů a receptorů pro bolest jsou v některých ohledech unikátní, jsou slibnými objekty cílené terapie bolesti lokálními anestetiky nebo analgetiky.

Nakonec modality o nichž toho víme nejméně. Trochu tajemné, protože nepatříme mezi vyvolené organismy.

Elektrorecepce a mechanorecepce

Cítění přes TRP kanály

Lidský genom kóduje stovky iontových kanálů, které mohou být klasifikovány do několika desítek kanálových rodin nebo čeledí s vysoce rozdílnými strukturami a funkčními vlastnostmi. Funkce kanálu je determinována dvěma klíčovými vlastnostmi: typem iontu, které mohou pronikat pórem (selektivita) a signály, které regulují otevírání a zavírání póru - kanálové vrátkování.

Zde se soustředíme na TRP superrodinu, specifickou třídu kanálů, které se otevírají v odpověď na celou škálu chemických a fyzikálních stimulů. Díky této škále vrátkování, TRP kanály slouží jako univerzální senzory, které dovolují buňkám a celým organismům detekovat změny v jejich prostředí. Během evolučního vývoje došlo k pozoruhodné specializaci těchto bílkovinných komplexů tak, že mohou měnit svou konformaci vlivem různých chemických i fyzikálních podnětů: mohou hrát roli termo, chemo, foto, mechanosenzorů i detektorů kyselosti, bolesti. Zkrátka téměř všech prozkoumaných modalit.

Tato skutečnost vedla k tomu, že na rozdíl od tradičního členění jiných iontových kanálů založeného na funkci, specifických ligandech nebo selektivitě, TRP kanály jsou klasifikovány podle homologie primárních aminokyselinových sekvencí.

Nedávná molekulární identifikace teplotně aktivovaného iontového kanálu TRPV1, který se uplatňuje v přenosu bolestivých podnětů na primárních nociceptivních neuronech, vedla k prudkému zvýšení zájmu fyziologů o další iontové kanály této skupiny a díky rozsáhlým a cíleným genomickým projektům naznačila existenci obecných molekulárních principů sensorické transdukce.

TRP receptory nacházíme již od vývojově nejnižších organismů, např. kvasinky jejich pomocí rozpoznávají osmolalitu prostředí, hlístice (*Caenorhabditis elegans*) se vyhýbají škodlivým chemickým látkám a octomilky (*Drosophila melanogaster*) reagují na světelné podněty. Savci prostřednictvím TRP receptorů rozpoznávají sladké a hořké chutě, teploty v rozsahu fyziologických i patofyziologických hodnot a chemické látky, které vyvolávají bolest. Některé TRP kanály fungují jako buněčná čidla, která převádějí změny okolního prostředí na produkci druhých posílů uvnitř buněk, a to především vápníku, čímž dochází k aktivaci nebo modulaci činnosti dalších receptorů.

U člověka bylo dosud identifikováno 27 genů pro TRP receptory a jejich fyziologická úloha byla prokázána v souvislosti s některými onemocněními, jako jsou poruchy metabolismu hořčičku (hypomagnezémie), polycystická onemocnění ledvin, nebo mukopolysacharidózy (poruchy odbourávání glykoproteinů a jejich hromadění ve tkáních). Některé podtypy TRP receptorů se nacházejí v nedráždivých buňkách, jako jsou např. keratinocyty, ledvinový epitel a prostata.

TRP historie začal v roce 1969, když Cosens a Manning objevili mutanta *Drosophily*, který ukazoval pouze přechodnou odpověď na silné světlo místo odpovědi trvalé. Analýza fotorecepčních buněk u mutanta odhalila, že trvalé světlo indukovalo pouze přechodný receptorový potenciál místo trvalého potenciálu s rovným plató. Proto byli pokřtěni *trp* Transient Receptor Potential.

2 desetiletí později *trp* gen byl klonován a bylo dokázáno, že kóduje Ca pouštějící kationtový kanál TRP. Potom byly u Dr. Identifikovány dva homologové. U všech bylo prokázáno, že přispívají k tvorbě světlem indukovaných proudů u fotorecepčních buněk.

TRP u D. funguje jako kanál přímo řízený receptorem, který je aktivován světlem indukovanou a fosfolipázou C zprostředkovanou hydrolýzou fosfatidylinositol 4,5 bisfosfátu (PIP₂). Stále se neví, zdali TRP se otevírá v odpověď na redukci hladiny PIP nebo je aktivován diacylglycerolem DAG anebo polyenasycenými m.k. odvozenými od DAG.

1995 byl identifikován první savčí homolog. To podnítilo hledání TRP příbuzných genů. Více než 50 TRP kanálů se našlo kvasinek, hlístů, hmyzu, ryb a savců. Díky úsilí v sekvencování genomu víme, že je 28 *trp* příbuzných genů u myši, 27 u lidí, 17 u háďátka *C.e.* a 13 u Dr. TRP kanály se klasifikují do 7 subrodin.

Základní architektura TRP je stejná jako u napětově vrátkovaných K kanálů. 4 podobné podjednotky se 6 transmembránovými doménami a spolu tetramerizují a vytvářejí funkční kanál. Obr. Cytoplasmatický N a C terminální konec jsou odpovědné za vrátkování kanálu. Dokonce mohou obsahovat celé funkční enzymy.

TRP jako termosensory

Zpočátku to vypadalo, že mají pouze význam jako kanály homeostatické – regulující zásoby iontů. To se změnilo, když byla užita technika exprese a klonování pro hledání receptorů pro kapsaicin – pálivou substanci chili papriček. Izolovali cDNA klon ze smyslových neuronů, které kódují Ca propouštějící kationtový kanál, který může být aktivován nejen kapsaicinem ale i škodlivým horkem nad 43°C. Byl to první identifikovaný člen TRP rodiny.

Od té doby byl popsáno 6 dalších teplotně sensitivních savčích TRP kanálů. Některé jsou aktivovány horkem, jiné chladem. Celkově vzato tyto TRP mají potenciál detekovat teploty v rozmezí 10-50°C. Obr. Což koresponduje s fyziologickým rozsahem teplot.

Mechanismus termosensitivity

Jak je to se specializací na určitou teplotu. Všeobecně vzato, teplotní závislost může být kvantifikována 10ti stupňovým koeficientem Q₁₀.

Všechny iontové kanály, stejně jako enzymy vykazují jistý stupeň teplotní citlivosti 1,2-1,4. Iontový flux skrze kanál se s teplotou zvyšuje, což se dá chápat jako důsledek teplotní stimulace difúze. Také klasické napětově vrátkované kanály mají Q₁₀ mezi 2-4. Avšak TRP ukazují mezi 6-30. Nadto, u chladově aktivovaných TRP proudy se snižují s teplotou. Z toho plyne že TRP jsou specializovány aby rozlišovaly a detekovaly malé odchylky teploty.

Na vysvětlení je několik možných mechanismů.

1) teplotně závislé enzymy mohou vést k produkci ligandů, které aktivují kanály. Podle tohoto modelu by to byly spíše enzymy než termo TRP sám o sobě, kdo tu je teplotně závislý. Víme-li ale, že termosensitivita TRP je dobře zachována i mimo buňky – na kouscích – vazba teplotně závislého ligandu je nepravděpodobná pro mechanismus.

2) Kanálová aktivace může vyvěrat z teplotně závislého fázového posunu lipidové membrány nebo konformační změny nebo denaturace přímo kanálového proteinu. Oboje se vyskytuje v poměrně úzkém teplotním okně, což by vysvětlovalo relativně strmou závislost termo TRP aktivace. Nemáme ale přímý důkaz.

3) Bylo zjištěno, že sensitivita je silně závislá na napětí na membráně. Je-li membrána depolarizována, kanál je aktivován při mnohem vyšších teplotách než při

fyziologičtějších negativních potenciálech OBR 3a. Termální sensitivita závisí na napětí a teplotně závislá aktivace je tedy zvyšováním pravděpodobnosti otevřeného stavu kanálu spíše než práhový fenomén. Taky je to argument proti teplotnímu fázovému posunu membrány nebo konformaci proteinu, protože to by ukazovalo jediný ostrý termální práh.

Život bez teploměru

Důležitý nový vhled do studie termosensitivy byl získán studiem geneticky modifikovaných myší, které měly zablokovanou expresi termo TRPs. Behaviorálně vzato, mutanti mají významně zpožděnou odpověď na bolestivé horko – ponoření ocasu do horké vody, nebo horkou plotýnku, ale mají normální odpovědi na mechanické stimuly.

Význam *Drosophila* genetiky umožnil reverzní přístup k molekulárním mechanismům citlivosti. Genetický skrínig mutantů s defektem v teplotní odpovědi vedl k identifikaci *painless* a *pyrexia* genů, které kódují TRP kanály. Mutanti jsou defektní ve vnímání škodlivých termálních stimulů. V jiné studii RNAi určila úlohu v termotaktickém chování larev. Našlo se TRP je nezbytné pro únikovou reakci v termálním gradientu.

TRP jako chemosensory

Iontový kanál TRPM5 nacházíme v sensorických buňkách exprimujících chuťové receptory T1R, T2R/TRB a metabotropní glutamátové receptory. Studie využívající Northern-blot analýzy ukázaly, že mRNA tohoto receptoru je obsažena také v žaludku, tenkém střevě a pankreatu. U myší, které postrádají TRPM5, je poškozeno vnímání sladké, hořké a umami („masové“) chutě, zatímco vnímání slaných a kyselých chutí zůstává zachováno. Tato zjištění naznačují, že TRPM5 je společný transdukční prvek, podílející se na přenosu a integraci signálů z různých chuťových receptorů.

TRP jako mechanosensory

Poprvé se jejich účast v mechanoreceptci prokázala u mutantů háďátka. Nevyhýbali se bolestivým dotekům, vysoké osmolalitě ani škodlivým chemikáliím. Přišlo se na to, že TRP mohou fungovat i jako mechanicky vrátkované kanály. To bylo potvrzeno objevem savčího osmoticky aktivního kanálu. Mutantní myši mají defekt v osmotické regulaci a termosensitivitě.

Jak TRP překládají mechanický stimul na vrátkování? Jsou 3 možné mechanismy: 1. tenze lipidické dvojvrstvy a otevření transmembránových segmentů, 2. přenos mechanické tenze na kanál prostřednictvím cytoplasmatických ocásků, možná připojených k endoskeletu, 3. enzym, který je citlivý na smrštění membrány a který mění aktivitu kanálu

První objevený savčí TRP kanál, TRPC1, se vyskytuje spolu s TRPC4 a TRPC5 kanály v mozkové kůře, hipokampu, mozečku a amygdale. Bylo prokázáno, že aktivace TRPC1 zprostředkovaná metabotropními glutamátovými receptory GluR1 a PLC β kaskádou je nezbytná pro vyvolání excitačních postsynaptických proudů na Purkyňových buňkách v mozečku, a proto je možné, že se tento iontový kanál uplatňuje v mechanismech neuronální plasticity (Kim et al., 2003). TRPC2 se podílí na vnímání feromonových signálů u myší, ale u člověka se vyskytuje pouze jako pseudogen. Samčí myši, které postrádají gen TRPC2 receptoru, nevykazují agresi typickou pro samce a páří se se samci i samicemi. Toto atypické chování je pravděpodobně způsobeno chybějící neuronální aktivitou v jejich vomeronazálních orgánech.

Vaniloidní receptory, dříve nazývané OTRPC, osm–9-like, byly pojmenovány podle specifického ligandu prvního identifikovaného savčího člena této rodiny TRPV1, vaniloidní látky kapsaicinu, účinné složky pálivých paprik. TRPV1 receptor je charakteristický tím, že k jeho aktivaci dochází podněty, které vyvolávají u člověka bolest (algogeny), jako jsou různé mediátory vznikající v místě poranění nebo zánětu, bradykinin, prostaglandin, serotonin, slabé kyseliny, ale také zvýšením okolní teploty nad 43 °C. Právě pro tuto vlastnost polymodální aktivace je vaniloidní receptor TRPV1 často nazýván „molekulárním integrátorem“ chemických a fyzikálních bolestivých podnětů. Na neuronech ganglií zadních kořenů míšních izolovaných z myši, u kterých byl uměle vyřazen gen TRPV1 receptoru, dochází k odstranění citlivosti na kapsaicin a slabé kyseliny. Rovněž se nezvyšuje citlivost mutovaných zvířat k teplotním podnětům během experimentálně navozeného zánětu, což dokazuje nezastupitelnou úlohu TRPV1 receptoru při vzniku tepelné hyperalgie (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000).

Nové poznatky o funkčních vlastnostech TRP receptorů prokazují, že tyto iontové kanály jsou molekulárními strukturami, jejichž prostřednictvím senzorycké neurony rozpoznávají podněty přicházející z okolního prostředí a umožňují tak organismům správně reagovat na ty, které je ohrožují.

Studium TRP kanálů je zajímavé nejen pro jejich univerzální roli ve smyslové transdukcii, ale i směřuje k hlubšímu porozumění mechanismům, které se uplatňují při vzniku některých onemocnění nervového systému a k cílenému hledání prostředků pro jejich léčbu. Jejich studiem se blížíme pochopení Ca citlivých mechanismů Ca regulace neexcitabilních buněk jako je aktivace T buněk, řízení apoptózy, proliferace, sekrece a buněčné migrace.

Objevení tRP superrodiny byl významný pokrok v porozumění molekulární podstaty smyslového vnímání. Uvažuje se o inkorporaci TRP do silikonových čipů a vznik biosenzorů.

Všimli jste si spolupráce s Neuroetologií, Behaviorální neurobiologií?

Závěrem: Buňky konzervativně využívají již vyzkoušených mechanismů k předávání signálů. Schopnosti buněk vidět slyšet, čichat se svými mechanismy neliší od schopností regulovat vývoj metabolismus zrání, diferenciaci, transport, metabolismus a homeostázu. Spíš pravděpodobně šlo o využití starších mechanismů a jejich napojení na nervovou dráhu komunikace zejména využitím specifických funkcí kanálů. Ty pak jsou základem nervového přenosu a zpracování dat.

Na příkladu TRP lze vidět jak vše souvisí se vším a studiem smyslových schopností poznáváme obecná pravidla molekulární komunikace.