

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Leona Loudová

Výskyt a vlastnosti teplotně aktivovaných TRP iontových kanálů v buněčných modelech
senzorických neuronů

Incidence and Properties of the Thermosensitive TRP Ion Channels in Cellular Models of
Sensory Neurons

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc za trpělivý přístup a cenné rady při psaní této bakalářské práce. Dále děkuji všem členům laboratoře Buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR za neocenitelné zkušenosti. Také bych chtěla poděkovat svému příteli Matějovi, rodině a blízkým přátelům za podporu a pochopení.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.5.2021

Podpis:

ABSTRAKT

Primární aferentní sensorické neurony umožňují živým organismům reagovat na vnější podněty, které je ohrožují, včetně škodlivých chemických látek, teploty a tlaku. Tyto pseudo-unipolární neurony představují heterologní populaci, která v závislosti na funkčních vlastnostech, morfologii, receptorové výbavě, stupni myelinizace a rychlosti vedení určuje, s jakou intenzitou bude podnět převeden na elektrický signál, který je následně veden do centrálního nervového systému tak, aby vyvolal obrannou reakci. Těla periferních sensorických neuronů jsou lokalizována v gangliích zadních míšních kořenů (DRG) a buněčné linie odvozené z těchto neuronů jsou intenzivně využívány nejen pro studium mechanismů bolesti, ale také pro racionální vyhledávání látek s potenciálním analgetickým účinkem. Hlavním cílem této bakalářské práce je shrnutí současného výzkumu molekulárních mechanismů nocicepce za využití buněčných linií odvozených z DRG neuronů se zaměřením na specifickou skupinu teplotně citlivých transienčních receptorových potenciálových (thermoTRP) iontových kanálů. Cílem je vypracování rešerše dostupných studií zaměřených na buněčné a molekulární rozdíly, které vyplývají z odlišných metodických přístupů přípravy a pěstování buněčných kultur, zejména v souvislosti s výskytem charakteristických znaků typických pro nociceptivní neurony.

Klíčová slova: immortalizované buněčné linie; F-11; sensorický neuron; ganglia zadních kořenů míšních; nocicepce

ABSTRACT

Primary afferent sensory neurons enable all living organisms to survive in their environment and react to dangerous stimuli, including noxious and irritant chemicals, temperature, and pressure. These pseudo-unipolar neurons represent a heterologous population that, depending on functional properties, morphology, receptor equipment, degree of myelination, and conduction velocity, determines the intensity at which a stimulus is converted to an electrical signal that is then conducted to the central nervous system to elicit defensive response. The cell bodies of the peripheral sensory neurons are localized in the dorsal root ganglia (DRG) and cell lines derived from these neurons are intensively used not only to study the mechanisms of pain, but also to rationally search for substances with potential analgesic effect. The main goal of this bachelor's thesis is to summarize the current research on molecular mechanisms of nociception using cell lines derived from DRG neurons with a focus on a specific group of temperature-sensitive transient receptor potential (thermoTRP) ion channels. The aim is to present currently available studies focusing on cellular and molecular differences that result from different methodological approaches to the preparation and cultivation of cell cultures, especially in the context of the functional expression of thermoTRP channels as one of the characteristics typical of nociceptive neurons.

Key words: immortalized cell lines; F-11; sensory neuron; dorsal root ganglion; nociception

Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
ADPR	ADP-ribosa
AITC	allylisothiokyanát
ANKTM1	TRPA1 kanál, ankyrinový transmembránový protein 1
BDNF	neurotrofický faktor odvozený z mozku
BHLH	základní šroubovice – smyčka – šroubovice
BMP	kostní morfogenetický protein
CGRP	peptid příbuzný genu pro kalcitonin
C-MC	C-vlákno aktivované mechanickým a chladovým podnětem
C-MHC	C-vlákno aktivované mechanickým, teplým a chladovým podnětem
C-MH	C-vlákno aktivované mechanickým a teplým podnětem
C-MiHi	C-vlákno mechano-necitlivé a teplo-necitlivé
CRISPR/Cas9	segmenty nahromaděných, pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit
DMEM	Dulbeccovo modifikované orlí médium
DRG	ganglia zadních kořenů míšních
EGTA	ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
F-11	linie hybridu potkaních embryonálních DRG neuronů a myších buněk neuroblastomu
FGF	fibroblastový růstový faktor
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GDNF	neurotrofický faktor odvozený od gliových buněk
Glu	aminokyselina glutamát
Gly	aminokyselina glycin
GSK3	glykogensynthasa kinasa-3, serin-threoninová proteinkinasa
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonická kyselina
HTMR	vysokoprahové mechanoreceptory
IB4	isolektin B4
iPKB	indukované pluripotentní kmenové buňky
<i>Kcna1</i>	gen kódující Kv1.1
Kv	draslíkové napětově řízené kanály
Kv1.1	napětově řízený draslíkový kanál, příbuzný podrodiny A, člen 1
LDN_193189	4-(6-(4-(Piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolin
LTMR	nízkoprahový mechanoreceptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
N18TG-2	mutant buněčné linie N18 z myši kmene A/Jax s neuroblastomem C1300
Nav	sodíkové napětově řízené kanály
Nav1.1	napětově řízený sodíkový kanál, typu 1
ND7/23	linie hybridních buněk myšího neuroblastomu (N18TG2) a potkaních DRG
NGF	neuronový růstový faktor
NPR	receptory pro neuropeptidy
OCT4	oktamer-vážíci transkripční faktor 4
P2X/Y	purinoreceptory ionotropní a metabotropní

PCA	analýza hlavních komponent
PIEZO2	komponent mechanosenzitivního iontového kanálu typu Piezo 2
PIP ₂	fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát
PS	pregnenolon sulfát
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
qRT-PCR	kvantitativní „real-time“ polymerázová řetězová reakce
S1 až S6	označení transmembránových α -helixů 1 až 6
SB431542	inhibitor TGF β
<i>Scn10a</i>	gen kódující sodný kanál Nav1.8
<i>Scn1a</i>	gen kódující sodný kanál Nav1.1
SOX2	SRY-Box transkripční faktor 2
TG	trigeminální ganglion
TGF β	transformující růstový faktor β
TrkA	tyrosinkinázový receptor
TRP	tranzientní receptorový potenciál
TRPA1	ankyrinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, podtyp 1
TRPC1-7	kanonický tranzientní receptorový potenciálový kanál, podtyp 1-7
TRP-like	strukturně analogický motiv k TRP-boxu TRPV1
TRPM1-8	melastatinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, podtyp 1-8
TRPML1-3	mukolipinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, podtyp 1-3
TRPP1-3	polycystinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, podtyp 1-3
TRPV1-6	vaniloidní tranzientní receptorový potenciálový kanál, podtyp 1-6
WNT	signální kaskáda Wingless/Int-1

Obsah

1. Úvod	1
2. Teplotně aktivované TRP iontové kanály	3
2.1 Teplem aktivované TRP iontové kanály	5
2.1.1 TRPV1.....	5
2.1.2 TRPV2.....	5
2.1.3 TRPV3.....	6
2.1.4 TRPV4.....	6
2.1.5 TRPM2.....	6
2.1.6 TRPM3.....	7
2.1.7 TRPA1.....	7
2.2 Chladem aktivované TRP iontové kanály	7
2.2.1 TRPM8.....	7
2.2.2 TRPC5.....	8
2.2.3 TRPA1.....	8
3. Primární aferentní sensorické neurony	8
4. Primární buněčné kultury DRG neuronů	12
5. Analýza genové exprese TRP receptorů v sensorických neuronech ..	14
5.1 Jednobuněčná analýza rozdílů v transkriptomických profilech	15
6. Modely sensorických neuronů odvozené od DRG neuronů	18
6.1 Linie buněk F-11	19
6.2 Linie buněk ND7/23	20
6.3 Sensorické neurony odvozené z pluripotentních kmenových buněk	20
7. Závěr	23
8. Použitá literatura	24

1. Úvod

Nervová zakončení primárních aferentních sensorických neuronů umožňují živým organismům reagovat na vnější podněty, které je ohrožují, včetně škodlivých chemických látek, mechanických podnětů a teplot, jež překračují fyziologický práh. Membrány těchto neuronů jsou vybaveny iontovými kanály, molekulárními senzory, které kódují vnější podněty na elektrický signál, jenž je následně veden do centrálního nervového systému tak, aby vyvolal obrannou reakci. Nejvýznamnější skupinou transdukčních iontových kanálů je rodina teplotně citlivých tranzientních receptorových potenciálových (TRP) kanálů, které jsou spolu s napěťově řízenými kanály odpovědné za generování akčních potenciálů (AP) a jejich vedení z periferie do mozku. Somatosenzorické neurony představují heterogenní populaci pseudo-unipolárních neuronů, které v závislosti na strukturách, jež inervují, receptorové výbavě, stupni myelinizace a rychlosti vedení určují, zda a s jakou intenzitou bude škodlivý podnět¹ určité modality převeden na elektrický signál. Těla somatosenzorických neuronů jsou lokalizována v gangliích zadních míšních kořenů (DRG) a v trigeminálních gangliích (TG). Buněčné linie odvozené z těchto neuronů jsou intenzivně využívány nejen jako významný model pro studium mechanismů nocicepce, ale také pro racionální vyhledávání látek s potenciálním analgetickým účinkem. Stále nedostatečná účinnost dostupných analgetik je závažným problémem zejména v terapii neuropatické bolesti, včetně bolestivých stavů indukovaných chemoterapeutiky a pozdních komplikací spojených s diabetem. Tyto formy bolesti jsou typicky manifestovány parestezií² a dysestezií³, tj. poruchami somatosenzorického systému zahrnujícími abnormální nebo poškozenou citlivost k teplotním podnětům. Významná úloha teplotně citlivých TRP kanálů v těchto dějích je prokázána v mnoha studiích.

Hlavním cílem předložené bakalářské práce je shrnutí výsledků současného výzkumu molekulárních mechanismů nocicepce za využití buněčných linií odvozených z DRG a TG

¹ **Škodlivý podnět***

Podnět, který poškozuje nebo hrozí poškozením normálních tkání.

² **Parestesie***

Abnormální somatosenzorický vjem vzniklý za nepřítomnosti zevního podnětu (spontánní mravenčení, mrazení, pálení apod.)

³ **Dysestesie***

Chybné vnímání reálného somatosenzorického podnětu (dotek jako pálení, horko jako chlad apod.)

neuronů se zvláštním zaměřením na specifickou skupinu teplotně citlivých tranzientních receptorových potenciálových (thermoTRP) iontových kanálů. Cílem je vypracování rešerše dostupných studií zaměřených na buněčné a molekulární rozdíly, které vyplývají z odlišných metodických přístupů k přípravě a pěstování buněčných kultur DRG a TG neuronů, zejména v souvislosti s výskytem charakteristických znaků typických pro nociceptivní⁴ neurony.

⁴ **Nocicepce***

Nervový proces kódování škodlivých podnětů.

Poznámka: Důsledky kódování mohou být autonomní (např. zvýšený krevní tlak) nebo behaviorální (odtahovací reflex nebo složitější nocifenzivní chování). Nemusí nutně docházet k pocitu bolesti.

Nociceptivní neuron

Centrální nebo periferní neuron somatosenzorického nervového systému, který je schopen kódovat škodlivé podněty. <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698> (přístup 28.4.2021)

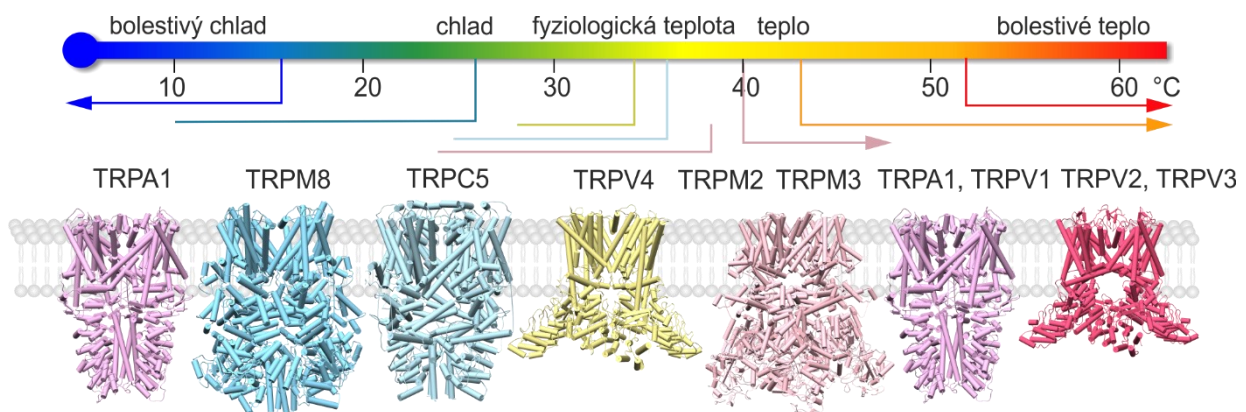
2. Teplotně aktivované TRP iontové kanály

Teplotně aktivované iontové kanály TRP rodiny umožňují všem živým organismům rychle detekovat teplotní podněty, které je ohrožují, a včas na ně reagovat. Jsou-li vnější podněty příliš horké, nebo příliš chladné, aktivace TRP kanálů na periferních zakončeních nociceptivních neuronů způsobí lokální depolarizaci buněčné membrány. Následný vznik AP, které jsou vedeny do centrálního nervového systému prostřednictvím napět'ově aktivovaných kanálů, umožní spuštění obranných mechanismů (Basbaum *et al.*, 2009). Systematická porovnání aminokyselinových sekvencí teplotně citlivých TRP proteinů u různých živočišných druhů a funkční studie využívající chimérické receptory *in vitro* nasvědčují procesům evoluční adaptace. To pravděpodobně díky TRP receptorům umožnilo živočichům přizpůsobit se extrémně chladnému, nebo naopak velmi teplému prostředí, případně se teplotám, které jsou pro ně škodlivé, vyhnout (Gracheva & Bagriantsev, 2015; Laursen *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2015).

TRP proteiny jsou u savců kódovány 28 různými geny a podle sekvenční homologie jsou děleny do 6 skupin: TRPC (kanonické), TRPV (vaniloidní), TRPM (melastatinové), TRPP (polycystinové), TRPML (mukolipinové) a TRPA (ankyrinové). Struktura TRP kanálů je tvořena čtyřmi podjednotkami uspořádanými symetricky. Podjednotky jsou buď shodné (homotetramer), nebo odlišné (heterotetramer). Struktura TRP podjednotky se skládá ze šesti transmembránových helixů (S1-S6) a intracelulárních N- a C-konců. Segmenty S1-S4 tvoří senzorovou doménu a segmenty S5 a S6, spolu s klíčkou mezi segmenty, vytvářejí centrální pór kanálu, který určuje selektivitu kanálu a obsahuje nejužší místa důležitá pro jeho vrátkování. Složení TRP podjednotek je klíčové pro biofyzikální a farmakologické vlastnosti tetrameru a jeho distribuci v plazmatické membráně (Cheng *et al.*, 2007; Clapham *et al.*, 2001; Staruschenko *et al.*, 2010). Většina TRP kanálů jsou neselektivní kationtové kanály propustné v různé míře pro Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty. Iontové kanály TRPC1-7, TRPV1-4, TRPM1,2,3,6,7,8, TRPA1, TRPP2,3,5 a TRPML1-3 mají hodnoty relativní propustnosti pro Ca^{2+} ionty ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) mezi 0.3 a 10. TRPM4 a TRPM5 jsou nepropustné pro Ca^{2+} ionty, zatímco TRPV5 a TRPV6 jsou selektivně propustné pro Ca^{2+} ionty ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$) (Owsianik *et al.*, 2006).

TRP kanály jsou molekulárními detektory rozpoznávajícími širokou škálu podnětů včetně mechanických, teplotních, napět'ových a chemických. Specifická podskupina teplotně aktivovaných TRP kanálů obsahuje senzory pro detekci změn okolní teploty. Každý z těchto tzv. termoreceptorů je stimulován ve svém určitém teplotním rozsahu (Obr. 1).

Dosud nejvíce prostudovaným teplotně aktivovaným TRP kanálem je TRPV1, který reaguje na bolestivé teplo ($> 43^{\circ}\text{C}$) a palčivou látku vyvolávající pocit tepla kapsaicin. Výskyt TRPV1 je jedním z hlavních identifikátorů nociceptivních neuronů (Caterina *et al.*, 1997). Dalšími termoreceptory z vaniloidní podskupiny TRP kanálů jsou TRPV2, TRPV3 a TRPV4. V literatuře je často uváděn TRPV3 jako receptor reagující na mírné teplo ($>30^{\circ}\text{C}$) (Peier, Reeve, *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002), skutečný práh aktivace je však mnohem vyšší ($>50^{\circ}\text{C}$) a snižuje se postupně s opakovanou stimulací (Liu & Qin, 2017). TRPV4 je aktivován teplotami okolo 30°C (Güler *et al.*, 2002). Mezi teplotně aktivované TRP kanály byly zařazeny TRPM2 a TRPM3 (Tan & McNaughton, 2016; Vriens *et al.*, 2011). Kromě kanálů aktivovaných teplem existují kanály reagující na chlad. Příkladem tohoto typu aktivace je TRPM8, jehož aktivitu lze vyvolat chladem ($<25^{\circ}\text{C}$) a řadou látek vyvolávajících chladivý vjem: mentolem, icilinem, eukalyptolem, linaloleem a kafrem. Jiným „chladovým kanálem“ je TRPA1, který má prahovou hodnotu aktivačního tepla oproti TRPM8 nižší (Story *et al.*, 2003), okolo 17°C . Rozsah primárních publikací zabývajících se problematikou teplotně aktivovaných TRP receptorů je obsáhlý a přesahuje rámec bakalářské práce. Základní i aktualizované informace a relevantní odkazy na literaturu jsou uvedeny např. v přehledné publikaci (Alexander *et al.*, 2019).



Obrázek 1: Teplotně aktivované TRP iontové kanály a rozsah jejich teplotní citlivosti. Schematické zobrazení topologického uspořádání jednotlivých TRP kanálů podle publikovaných struktur (zleva, Protein Data Bank ID: 6pqq, 6o6a, 6aei, 6bbj, 6puo, 6pqq, 5irx). Obrázek vytvořen autorkou práce, inspirován podle (Hoffstaetter *et al.*, 2018).

2.1 Teplem aktivované TRP iontové kanály

2.1.1 TRPV1

Prvním identifikovaným teplotně aktivovaným iontovým kanálem z rodiny TRP receptorů byl v roce 1997 TRPV1, původně nazývaný kapsaicinový, nebo také vaniloidní receptor VR1 (Caterina *et al.*, 1997). Podobně jako ostatní kanály TRP rodiny je TRPV1 tetramerní kanál s N- i C-konci podjednotek orientovanými dovnitř buňky. TRPV1 je polymodálním receptorem, to znamená, že jej lze aktivovat podněty různých modalit. Exogenními chemickými aktivátory TRPV1 jsou kapsaicin (8-methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide), alkaloid z paprik rodu *Capsicum*, a jeho ultrapotentní analog resiniferatoxin, nacházející se v latexu sukulentních prýšcovitých rostlin *Euphorbia resinifera*. Mezi exogenní aktivátory TRPV1 patří nejen řada dalších látek rostlinného původu vyvolávajících pocit tepla, pálení, štiplavosti a bolesti, ale také látky obsažené v jedu některých pavouků či medúz (Andersson *et al.*, 2002; Caterina *et al.*, 1997; Cuypers *et al.*, 2006; Siemens *et al.*, 2006). Jedny z hlavních endogenních aktivátorů kanálu TRPV1 jsou kanabinoidy, anandamid (N-arachidonoyletanolamin) (Zygmunt *et al.*, 1999) a protony (pH < 5.4) (Tominaga *et al.*, 1998). Kromě řady chemických látek je TRPV1 aktivován fyzikálními podněty včetně depolarizace membránového potenciálu ($V_{50} \sim 150$ mV) (Vlachová *et al.*, 2003) a škodlivého tepla, které převyšuje 42 °C (Caterina *et al.*, 1997).

2.1.2 TRPV2

V pořadí druhým molekulárně identifikovaným teplotně aktivovaným TRP receptorem byl TRPV2, kterého autoři nejdříve označili na základě sekvenční homologie s TRPV1 jako „vanilloid receptor-like protein-1 (VRL-1)“. TRPV2 je aktivován nefyziologickými teplotami převyšujícími práh 52 °C (Caterina *et al.*, 1999). Mezi chemické aktivátory TRPV2 patří kanabinoidy (Qin *et al.*, 2008) a probenecid, lék používaný při léčbě dny (Bang *et al.*, 2007). TRPV2 kanál je významně exprimován v aferentních senzoričkových neuronech (Caterina *et al.*, 1999) a v podmínkách *in vitro* je možné jej aktivovat teplem >50 °C a hypoosmotickými podněty (Liedtke & Friedman, 2003). Geneticky modifikované myši, u kterých je vyřazen gen pro TRPV2, vykazují poruchy v osmotické regulaci, jejich citlivost na teplo se však nijak neliší od divokého typu (Caterina *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2011). Funkční význam tohoto kanálu z hlediska teplotní modalit není tedy stále zcela znám.

2.1.3 TRPV3

TRPV3 také sdílí významnou homologii v aminokyselinové sekvenci s TRPV1. K stimulaci TRPV3 dochází již při fyziologických teplotách v rozmezí 33-39 °C (Peier, Reeve, *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). Za podmínek *in vivo* je TRPV3 tonicky senzitivován, v podmínkách *ex vivo* je práh aktivace vyšší než 50 °C a při opakované aktivaci se snižuje k 30 °C (Liu & Qin, 2017). Chemickými aktivátory TRPV3 je řada terpenoidních látek obsažených v některých aromatických rostlinách jako například eugenol z hřebíčku, karvakrol z oregana a thymol obsažený v tymiánu (Moqrich *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Podobně jako příbuzné kanály TRPV1 a TRPV2 je TRPV3 aktivován 2-aminoetoxydifenylborátem (Hu *et al.*, 2004). Studie na geneticky modifikovaných myších s vyřazeným genem pro TRPV3 prokázaly funkční význam toho receptoru v pocíťování bolestivých teplot (Moqrich *et al.*, 2005).

2.1.4 TRPV4

TRPV4 je polymodálním receptorem aktivovaným teplotami nad 30 °C a mechanickými a osmotickými podněty (Liedtke *et al.*, 2000; Liedtke & Friedman, 2003; Watanabe *et al.*, 2002). Původní studie využívající transgenní myší modely prokázaly důležitou úlohu TRPV4 v rozvoji teplotní hyperalgie, astmatu, neuropatické bolesti, poruch osmoregulace, hypertenze a detekce teplot. Pozdější studie však prokázaly, že změny v teplotní preferenci geneticky modifikovaných myší, u nichž byly současně vyřazeny geny pro TRPV3 a TRPV4, souvisí s genetickým pozadím, nikoliv s přítomností těchto receptorů (Vriens *et al.*, 2014). Genetické poruchy v genu kódujícím TRPV4 u lidí jsou příčinou velmi závažných onemocnění včetně skeletálních dysplazií a neurodegenerativních onemocnění (Nilius & Bíró, 2013).

2.1.5 TRPM2

TRPM2 receptor je aktivován teplotami vyššími než 35 °C (Togashi *et al.*, 2006). Tento receptor je exprimován na DRG neuronech (Tan & McNaughton, 2016) a nachází se také v buňkách slinivky břišní, kde je koexprimován s inzulinem (Togashi *et al.*, 2006). TRPM2 je aktivován reaktivními formami kyslíku (ROS). Účastní se zánětlivé produkce cytokinů a udržování tělesné teploty (Perraud *et al.*, 2005; Togashi *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2013). Při vysokých koncentracích ROS se v buňkách zvyšuje hladina ADP-ribosy (ADPR), která je přímým ligandem TRPM2. TRPM2 je aktivován také Ca²⁺ ionty, kalmodulinem a fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátem (PIP₂) (Gattkowsky *et al.*, 2019; Tóth & Csanády, 2012; Xia *et al.*, 2019).

2.1.6 TRPM3

TRPM3 je aktivován teplem v rozsahu 25-40 °C. Tento kanál reaguje na nižší teploty než například TRPV1, ale zato má širší rozsah teplot. TRPM3 je exprimován v DRG, TG a podobně jako TRPM2 v buňkách slinivky břišní, kde je koexprimován s inzulinem (Vriens *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2008). Agonistou TRPM3 je pregnenolon sulfát (PS). Společně s TRPV1 a TRPA1 je hlavním iontovým kanálem zodpovědným za detekci bolestivého tepla (Vandewauw *et al.*, 2018).

2.1.7 TRPA1

Savčí TRPA1 je kanál patřící do podskupiny ankyrinových TRP kanálů a je jediným členem této podskupiny. Poprvé tento kanál identifikovala skupina Jaquemar *et al.* v roce 1999 jako protein kódovaný 1119 triplety v fibroblastech člověka (Jaquemar *et al.*, 1999). O čtyři roky později skupina Story *et al.* charakterizovala TRPA1 jako excitační iontový kanál na primárních aferentních neuronech a prokázala jeho aktivaci chladem a dráždivými látkami (Story *et al.*, 2003). Podle 16-ti ankyrinových repetitivních sekvencí rozpoznaných na N-konci byl nazván nejdříve ANKTM1 (angl. ankyrin-like with transmembrane domains protein 1), později podle nomenklatury zařazen do skupiny TRPA. Tento receptor je exprimován na DRG neuronech a TG neuronech společně s TRPV1. Na DRG neuronech je exprimován zejména na C- a A δ -vláknech (Kobayashi *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2005; Story *et al.*, 2003). Mezi elektrofilní aktivátory TRPA1 patří allylisothiokyanát (AITC), látka vyskytující se v hořčicovém oleji a křenu, alicin, který je obsažen v česneku, skořicový aldehyd a akrolein (akrylaldehyd). Příkladem neelektrofilních agonistů TRPA1 jsou mentol a karvakrol. Společně s TRPV1 a TRPM3 je TRPA1 hlavním iontovým kanálem zodpovědným za detekci bolestivého tepla (Vandewauw *et al.*, 2018). Genetickým odstraněním TRPV1, TRPM3 a TRPA1 u myši dochází ke ztrátě citlivosti k bolestivým teplotám, citlivost na chlad a mechanické podněty zůstává zachována.

2.2 Chladem aktivované TRP iontové kanály

2.2.1 TRPM8

TRPM8 je kanál z rodiny melastatinových TRP receptorů. Tento iontový kanál byl molekulárně identifikován v roce 2002 a označen jako chladem a mentolem aktivovaný receptor (angl. cold- and menthol-sensitive receptor 1; CMR1) (González-Ramírez *et al.*, 2019; McKemy *et al.*, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002). TRPM8 je aktivován teplotami pod

26 °C a také látkami vyvolávajícími chladivý pocit, jako jsou mentol, eukalyptol, linalool, icilin a kafr. TRPM8 je exprimován v DRG, TG (Abe *et al.*, 2005; Nealen *et al.*, 2003) a sliznici úst (Abe *et al.*, 2005). Je doloženo, že kanál TRPM8 je u lidí hlavním zprostředkovatelem pocitu bolestivého chladu (Winchester *et al.*, 2014). Kromě detekce mírně chladných teplot je studována úloha TRPM8 v chronické migréně (Dussor & Cao, 2016) a u chronického pruritu (Ständer *et al.*, 2017).

2.2.2 TRPC5

TRPC5 je zatím jediným kanálem patřícím do kanonické podskupiny TRP rodiny, pro něž byla prokázána specifická aktivace změnami teploty. Tento iontový kanál je stimulován snížením teploty z 37 °C na 25 °C (Zimmermann *et al.*, 2011). Předpokládá se, že TRPC5 se spolu s TRPM8 a TRPA1 podílí na převodu chladových podnětů. Geneticky modifikované myši, u kterých není funkční *TRPC5* gen, nevykazují oproti standardnímu typu odlišnou teplotní preferenci, nebo odlišné chování k akutnímu působení bolestivého chladu a tepla. Na buněčné úrovni je však patrné snížení počtu chladem aktivovaných neuronů nezávisle na jejich citlivosti k mentolu. Úloha TRPC5 jako senzoru bolestivého chladu byla prokázána ve zcela nedávné době v odontoblastech (Bernal *et al.*, 2021).

2.2.3 TRPA1

Do podskupiny chladem aktivovaných TRP kanálů je řazen TRPA1, který je popsán výše jako jeden z kanálů nezbytných pro detekci bolestivého tepla (>50°C) (Vandewauw *et al.*, 2018). Fyziologická úloha TRPA1 jako chladového senzoru byla prokázána studiiemi na geneticky modifikovaných myších (Bandell *et al.*, 2004; Karashima *et al.*, 2009). TRPA1 je aktivovaný chladem < 15 °C (Story *et al.*, 2003), což se blíží prahu bolesti.

3. Primární aferentní senzory neurony

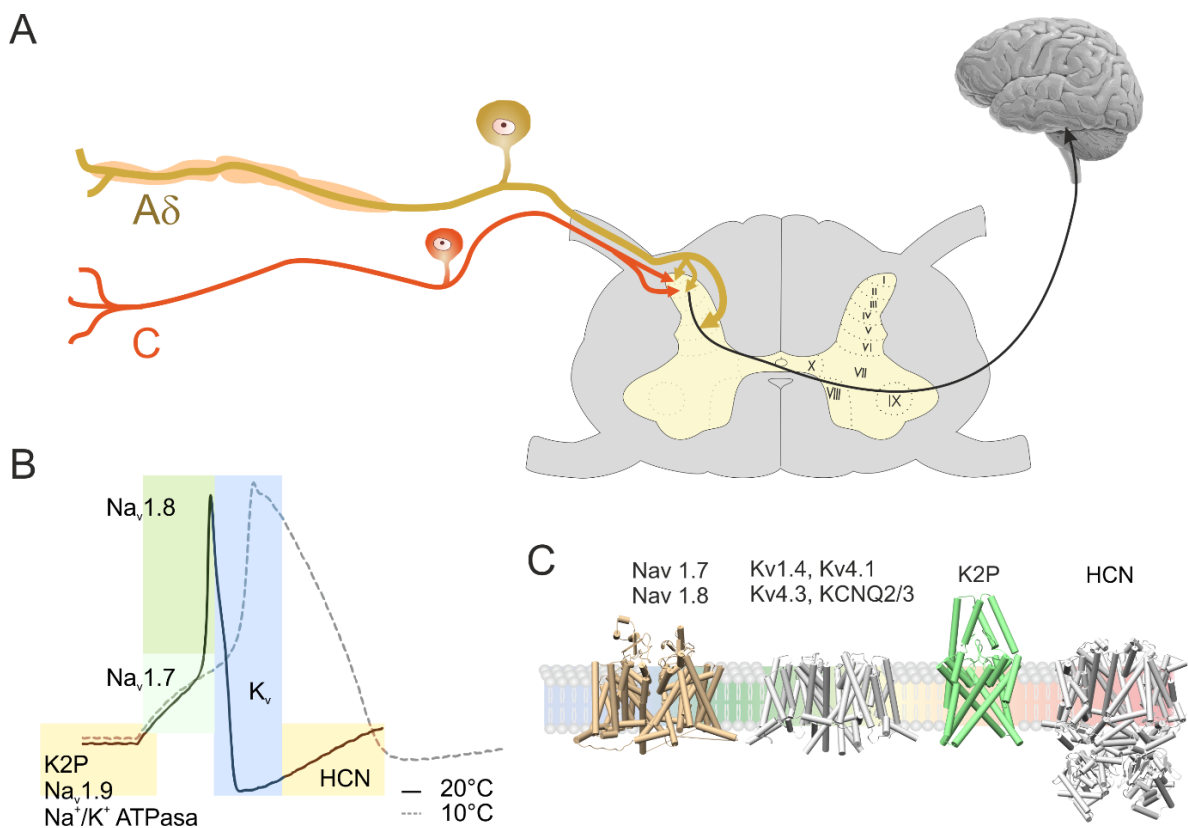
Přibližně dvě třetiny DRG neuronů lze podle elektrofyziologických kritérií považovat za nociceptory⁵, zbývající třetina je charakterizována jako nenociceptivní (Kitchener *et al.*, 1993). Mezinárodní asociace pro studium bolesti (IASP, International Association for the Study of Pain) definuje nocicepci jako neurální proces kódování škodlivých podnětů. Tyto

⁵ Nociceptor*

Vysokoprahový senzory receptor periferního somatosenzorického nervového systému, který je schopen transdukovat a kódovat škodlivé podněty.

<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698> (přístup 28.4.2021)

podněty jsou detekovány nociceptory, jejichž aktivace však nemusí vždy vést k pocíťování bolesti. Bolest vyžaduje rozpoznávací a emoční zpracování v mozku, zatímco nocicepce nikoli. Jakmile se podnět přenášený nociceptivními mechanizmy dostane až do kortexu mozku a je zde zpracován, nastává vědomý pocit bolesti (Obr. 2). Správné fungování převodu těchto potenciálně škodlivých podnětů je velmi důležité pro to, aby bylo možné včas předejít poškození tkání. Za různých patologických podmínek se stává, že je tento proces kódování senzitivován. To může vést k bolestivému pocíťování i neškodných podnětů (Zeilhofer, 2005).



Obrázek 2: Teplotní aktivace primárních aferentních sensorických neuronů. **(A)** Schematické znázornění primárních aferentních vláken nociceptivních neuronů A δ a C a jejich centrální zakončení v laminách I, II a V míchy. Informace o teplotním podnětu je vedena neurony druhého řádu ascendentním spinothalamickým traktem (černá křivka) do thalamu a dále přenášena do somatosenzorického kortexu. **(B)** Hlavní molekulární komponenty akčního potenciálu vedeného z periferie do centrálního nervového systému. Vliv chladu na typický tvar akčního potenciálu je označen barevnými oblastmi podle fází příspěvku jednotlivých typů napětově řízených iontových kanálů. **(C)** Porovnání membránové topologie iontových kanálů určujících vlastnosti teplotně citlivých nociceptivních neuronů (mezi specificky teplotně citlivé K2P kanály patří TREK-1, TREK-2 a TRAAK). HCN, hyperpolarizací aktivovaný, cyklickými nukleotidy otevíraný kanál. Panely A a C jsou vytvořeny autorkou práce, panel B je upraven podle (Hoffstaetter et al., 2018).

Na základě funkčních a imunohistochemických metod byly v literatuře tradičně odlišovány dva základní podtypy primárních nociceptivních neuronů. První skupinou jsou tzv. *peptidergní neurony* obsahující neuropeptidy, konkrétně substanci P (undekapeptid ze skupiny tachykininů) a CGRP (angl. calcitonin-gene related peptide), jež jsou charakteristické vyšší citlivostí k nociceptivním teplotním podnětům. Funkce peptidergních neuronů je prostřednictvím tyrosinkinasového receptoru TrkA regulována neurotrofickým faktorem NGF (nervový růstový faktor). Centrální zakončení těchto neuronů je ve vrstvě I a vnější části vrstvy II neuronů zadních rohů míšních. Biochemicky odlišnou skupinou jsou neurony, které specificky vážou rostlinný lektin izolovaný ze semen africké luštěniny *Griffonia simplicifolia*, isolektin B4 (IB4) (Kitchener *et al.*, 1993). IB4 pozitivní neurony exprimují ve zvýšené míře funkční sodné kanály necitlivé k tetrodotoxinu Nav1.9, což se projevuje delším trváním AP (Fang *et al.*, 2006). Centrální zakončení IB4 pozitivních neuronů je převážně ve vnitřní vrstvě II.

Smyslové systémy převádějí podněty na elektrické a chemické nervové signály. Primární aferentní nociceptivní neurony rozpoznávají více druhů podnětů, často fyzikální i chemické povahy. Nociceptivní neurony jsou navíc vybaveny množstvím receptorů, které mohou být polymodální, což znamená, že jeden receptor může transdukovat více podnětů různých modalit (Knowlton *et al.*, 2013). Těla somatosenzorických neuronů se nacházejí v trigeminálních nebo dorzálních kořenových gangliích. Tam jsou metabolicky a strukturně podporovány satelitními gliovými buňkami (Hanani, 2005).

Podrobné funkční a anatomické studie aferentních nociceptivních neuronů *in vivo* ukázaly, že lze odlišit různé podtypy neuronů (Tab. 1). Hlavními vlastnostmi, na základě kterých jsou primární aferentní vlákna rozdělena na čtyři podtypy – A α , A β , A δ , a C-vlákna, jsou myelinizace, průměr, rychlost vedení a prahové hodnoty aktivace (Olson *et al.*, 2016). V periferním nervovém systému představují většinu neuronů C-vlákna (Dubin & Patapoutian, 2010; Millan, 1999). Na periférii mají A δ a C-vlákna volná nervová zakončení, ta mohou být asociována se Schwannovými buňkami nebo keratinocyty (Lewin & Moshourab, 2004). Jako vysokoprahové nociceptory (HTMR; angl. high-threshold mechanoreceptors) slouží za normálních fyziologických podmínek pouze neurony s vlákny A δ a C malého a středního průměru (Julius & Basbaum, 2001). U bolesti somatické jsou rozlišovány dvě fáze, první – rychlá a ostrá bolest zprostředkována A δ vlákny a druhá – zpožděná a tupá, kterou zprostředkovávají C-vlákna. U bolesti viscerální je bolest většinou špatně lokalizovaná a tupá

(Cervero & Laird, 1999; Julius & Basbaum, 2001). Vlákna A δ a C mohou být identifikována také jako nízkoprahová (LTMR– low-threshold mechanoreceptors) (Olson *et al.*, 2016).

A δ vlákna můžeme rozdělit do dvou typů, a to A δ -LTMRs a A δ -HTMRs. A δ -LTMRs, neboli D- vlasové buňky, které podélně obklopují vlasové folikuly. Tato vlákna mají velmi nízkou mechanickou prahovou hodnotu (Djoughri, 2016; Olson *et al.*, 2016). A δ -HTMRs jsou dále dělena na dva hlavní typy I a II. Typ I reaguje jak na chemické, tak na mechanické podněty. Neurony typu I mají vysokou prahovou hodnotu pro podněty převyšující přibližně 53 °C, ale po dlouhodobém působení, nebo po poškození tkáně, jsou tyto neurony senzitivovány. Za iniciální fázi akutní bolesti vyvolané mechanickým podnětem je zodpovědný právě tento typ vláken. A δ vlákna typu II mají vysokou prahovou hodnotu pro aktivaci mechanickými podněty, ale nižší pro aktivaci tepelnými podněty převyšujícími přibližně 43 °C. Právě tato vlákna zprostředkovávají akutní bolest po zasažení škodlivým teplem (Basbaum *et al.*, 2009; Julius & Basbaum, 2001).

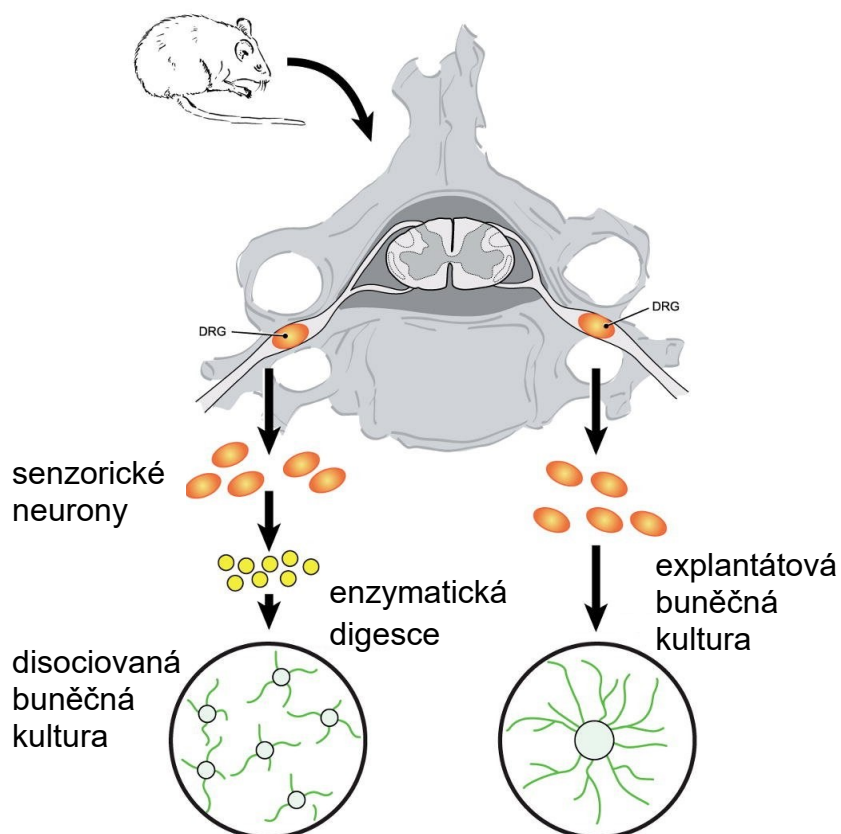
C- vlákna primárních aferentních neuronů jsou polymodální. Znamená to, že reagují na škodlivé mechanické i tepelné podněty. Byla proto rozdělena podle typů podnětů, které tato vlákna aktivují. Rozlišujeme C- vlákna citlivá na mechanické podněty a teplo (C-MH; angl. mechano-heat), mechanické podněty a chlad (C-MC; angl. C-mechano-cold) a na mechanické podněty, teplo a chlad (C-MHC; angl. C-mechano-heat-cold) (Lewin & Moshourab, 2004). Další skupinou C- vláken jsou mechanosenzitivní C-LTMR, která zprostředkovávají příjemný pocit při dotyku (Olson *et al.*, 2016). Poslední typ C- vláken, který nevykazuje žádnou citlivost za fyziologických podmínek, byl nazván C-mechano-necitlivé, teplo-necitlivé nociceptory (C-MiHi), přezdívané „spící“. Při senzitivaci alogeny mohou tyto nociceptory reagovat na teplé podněty a tlak. Vlákna C-MiHi inervují všechny tkáně, hlavně viscerální orgány a klouby (Gebhart, 2000; Lewin & Moshourab, 2004).

Typ vláken	Myelinizace	Průměr vláknů (μm)	Rychlost šíření (m.s ⁻¹)	Typy mechanoreceptorů	Inervované struktury	Modalita
Aα	Silně myelinizované	12-20	Rychlé; 72-120	Ia	Svalové vřeténko	Limbská propriorecepce
				Ib	Golgiho šlachové tělísko	Limbská propriorecepce
Aβ	Silně myelinizované	6-12	Rychlé; 36-72	RAI-LTMRs	Meissnerovo tělísko	Dotyk (pohyb)
				RAII-LTMRs	Vaterovo-Paciniho tělísko	Dotyk (vibrace)
				SAI-LTMRs	Merkelova buňka	Dotyk (tlak)
				SAII-LTMRs	Ruffiniho tělísko	Dotyk (natahování kůže)
Aδ	Slabě myelinizované	1-6	Středně rychlé; 4-36	Aδ-HTMRs (Typ I, Typ II)	Volné nervové zakončení	Termorecepce Nocicepce
				Aδ-LTMRs (D-hair)	Vlasové folikuly	Pohyb vlasů
C	Nemyelinizované	0,2-1,5	Pomalé; 0,4-2,0	Polymodální C-vlákná C-MH C-MC C-MHC	Volné nervové zakončení	Termorecepce Nocicepce
				C-LTMRs	Volné nervové zakončení	Dotyk
				C-MiHi	Volné nervové zakončení	Tiché („spící“)

Tabulka 1: Klasifikace a porovnání vlastností primárních aferentních sensorických vláken. Tabulka převzata a upravena (Dubin & Patapoutian, 2010).

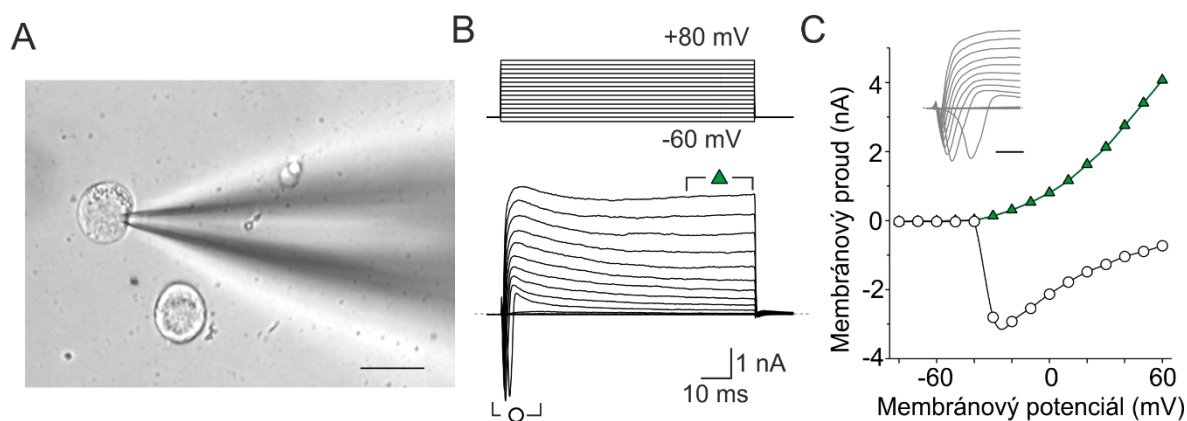
4. Primární buněčné kultury DRG neuronů

Na Obr. 3 je schematicky znázorněn postup přípravy primárních buněčných kultur DRG neuronů. Pro studium teplotně citlivých TRP receptorů je tento model používán již od poloviny 80. let minulého století (Baccaglini & Hogan, 1983; Melli & Höke, 2009). V podmínkách tkáňových kultur je velmi obtížné identifikovat funkční podtypy nociceptivních neuronů uvedené v přechozí kapitole. Většinou jsou rozlišovány na základě elektrofyziologických a imunohistochemických vlastností (Woolf & Ma, 2007).



Obrázek 3: Schematické znázornění přípravy primárních buněčných kultur disociovaných neuronů zadních míšních kořenů (DRG) a explantátových kultur. Upraveno podle (Melli & Höke, 2009).

Hlavním kritériem pro identifikaci nociceptoru je zejména výskyt charakteristické skupiny napětově řízených iontových kanálů (Obr. 2) a přítomnost teplotně citlivých TRP kanálů, převážně TRPV1, TRPM8 a TRPA1. Pro funkční vyšetření jsou většinou vybírány neurony malého průměru, u nichž je předpoklad, že představují těla tenkých nemyelinizovaných C-vláken. Napětovou stimulací je elektrofyziologickou technikou vyšetřován charakter proudových odpovědí a poté farmakologicky testována přítomnost jednotlivých podtypů iontových kanálů (TRPV1, kapsaicin 1-10 μM ; TRPA1, allylisothiokyanát 100-150 μM ; TRPM8, mentol 100 μM ; TRPV3, TRPA1, karvakrol 50-150 μM). Příklad základního elektrofyziologického vyšetření proudově-napětové charakteristiky DRG neuronu izolovaného z dospělé myši je znázorněn na Obr. 4.



Obrázek 4: Typická ukázka snímání elektrické aktivity z neuronu disociovaného z ganglií zadních míšních kořenů dospělé myši. (A) Snímání technikou patch-clamp v konfiguraci „whole-cell“ z vybraného neuronu. Měřítka: 20 μm . (B) Repräsentativní záznam superponovaných membránových proudů aktivovaných napětovým protokolem zobrazeným nad záznamem. Maximální odpověď Na^+ -proudů je měřena v oblasti označené symbolem (○), maximální odpověď K^+ -proudů je měřena v oblasti označené symbolem (▲). (C) Graf zobrazující napětovou závislost maximálních membránových proudů odečtených v oblastech znázorněných v panelu B. Vložený detail je záznam proudů v časovém rozlišení umožňujícím rozlišit Na^+ -složku v oblasti vyznačené v panelu B symbolem (○). Časové měřítko: 2 ms. Chemikálie: Extracelulární roztok: 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glukóza, pH 7.3, osmolalita 320 $\text{mmol} \times \text{kg}^{-1}$. Intracelulární roztok: 150 mM K-glukonát, 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, pH 7.4, osmolalita 298 $\text{mmol} \times \text{kg}^{-1}$. Záznam byl pořízen autorkou v laboratoři Buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR v rámci přípravy této bakalářské práce.

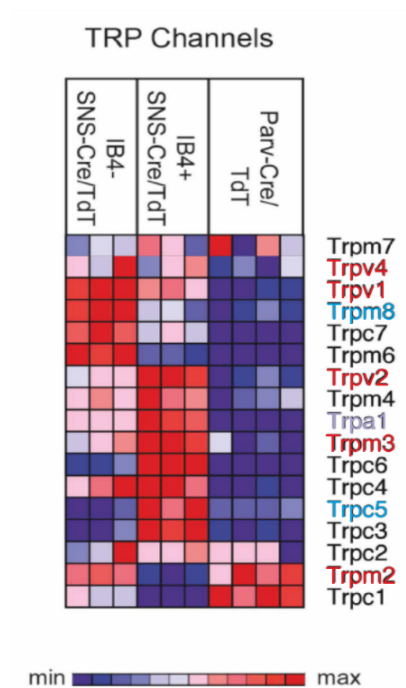
5. Analýza genové exprese TRP receptorů v senzoryckých neuronech

Studium metabotropních receptorů a genové exprese iontových kanálů, které jsou charakteristické pro nociceptivní, puriceptivní a propioceptivní neurony, bylo umožněno teprve nedávno díky rozvoji transkriptomických technik. Expresní profily „intaktních“ ganglií byly porovnány s daty získanými z buněčných linií odvozených z neuronů ganglií zadních míšních kořenů nebo trigeminálních ganglií. Bylo potvrzeno, že buněčné kultury disociovaných DRG neuronů, jež představují heterogenní populaci, nemusí odrážet skutečné funkční vlastnosti nativních nociceptorů a z hlediska výskytu farmakologicky relevantních receptorů mohou vykazovat podstatné vývojové i pohlavní rozdíly (Chiu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Mecklenburg *et al.*, 2020; Usoskin *et al.*, 2015; Wangzhou *et al.*, 2020). Z hlediska oprávněnosti využití buněčných modelů, zejména pro účely vysoce výkonných metod vyhledávání látek s potenciálním farmakologickým účinkem, jsou také v posledních několika letech studovány rozdíly mezi vlastnostmi nociceptorů izolovaných z experimentálních myši

a lidských DRG neuronů. V nedávné době byly například popsány významné mezidruhové rozdíly v účincích signalizačních drah modulujících aktivitu TRPV1 receptoru prostřednictvím metabotropních glutamátových receptorů (Sheahan *et al.*, 2018). Některé hlavní publikované výsledky studií, umožňující porovnání míry exprese RNA transkriptů specifické skupiny teplotně citlivých TRP kanálů v buněčných modelech senzoričkových neuronů a nociceptorů za různých podmínek *in vivo* a *in vitro*, jsou popsány v dalším textu a shrnuty v Obr. 5 a Tabulkách 2 a 3.

5.1 Jednobuněčná analýza rozdílů v transkriptomických profilech

V roce 2014 skupina Clifforda Woolfa z Bostonu prokázala existenci tří základních nepřekrývajících se skupin DRG neuronů za využití qRT-PCR (kvantitativní „real-time“ polymerázová řetězová reakce) a průtokové cytometrie. Autoři využili dvě různé transgenní myší linie umožňující identifikaci DRG senzoričkových neuronů v kombinaci s imunohistochemickým značením neuronů isolektinem IB4. Využity byly dvě reportérové myší linie: SNS-Cre/TdTomato, která pod promotorem *Scn10a* (kódující Nav1.8) exprimovala Cre, a která byla vystavena změně genu, jež ovlivnila vnímání tepla, svědění nebo bolesti. Druhá transgenní myší linie Parv-Cre/TdTomato, exprimující Ires-Cre pod promotorem parvalbuminu, umožnila rozlišit proprioceptivní neurony. Na základě značení IB4 byly rozpoznány nociceptivní, pruriceptivní a proprioceptivní neurony (Tab. 2). Paralelní qRT-PCR analýza 334 jednotlivých neuronů umožnila objektivními metodami analyzovat míry exprese charakteristických iontových kanálů, transkripčních faktorů a metabotropních receptorů. Tyto základní tři typy neuronů lze dále rozdělit na šest skupin (Chiu *et al.*, 2014).

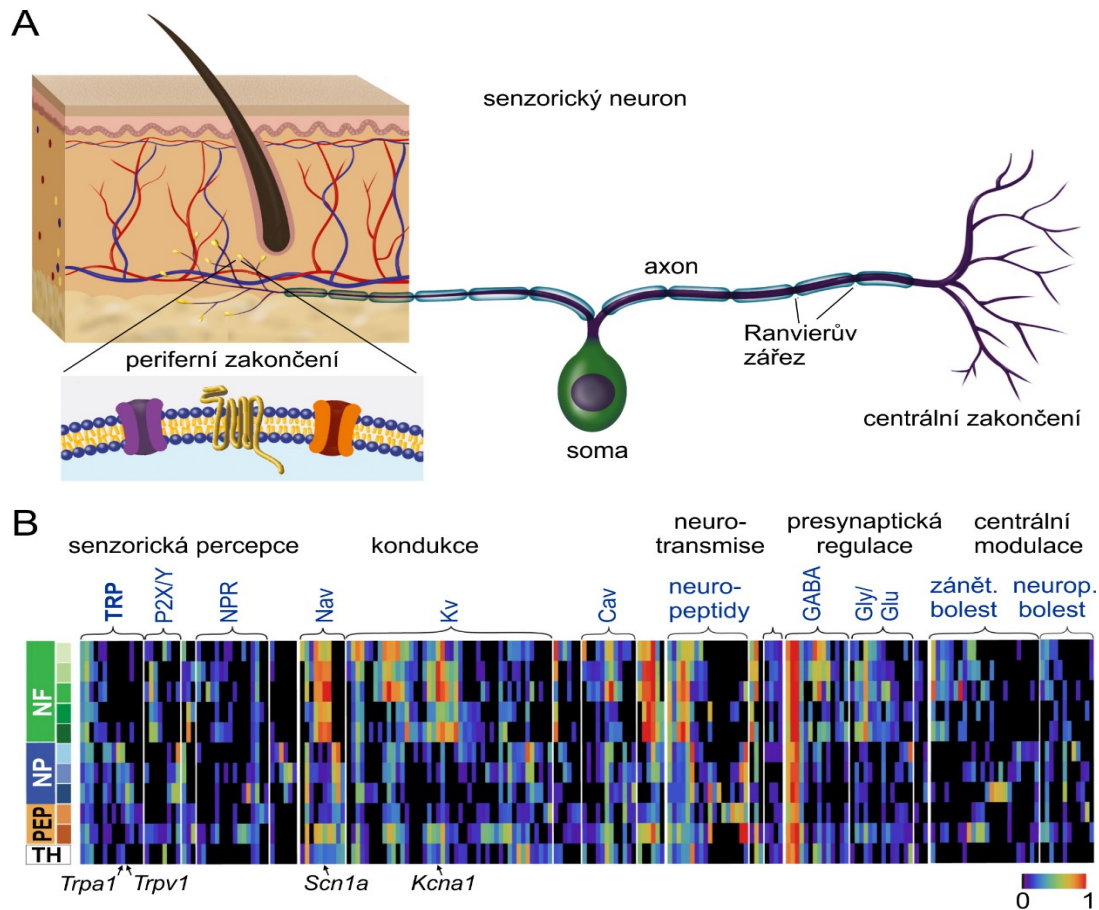


Tabulka 2: Relativní exprese genů kódujících TRP receptory v jednotlivých podtypech DRG neuronů. Tabulka upravena z (Chiu et al., 2014).

V roce 2015 bylo na souboru obsahujícím 622 akutně disociovaných neuronů myších spinálních ganglií (L4-L6), díky kombinaci metod jednobuněčné transkriptomové a imunohistochemické analýzy, rozpoznáno 11 různých podtypů senzoričkových neuronů (Usoskin et al., 2015). V první fázi analýzy byly rozlišeny 4 základní skupiny neuronů. NF klastr byl rozlišen podle přítomnosti genů označujících myelinizované DRG neurony. Mezi tyto geny patří geny pro neurofilamentový těžký polypeptid (*Nefh*, 200 kDa) a Ca^{2+} vazebný protein parvalbumin (*Pvalb*), jeden z hlavních indikátorů proprioceptorů (Ichikawa & Sugimoto, 2000). PEP klastr vykazuje expresi genu pro substanci P (*Tac1*), genů kódujících tyrosinkinazový receptor pro neurotrofin TrkA (*Ntrk1*) a peptid příbuzný genu pro kalcitonin (CGRP; angl. calcitonin gene-related protein, *Calca*), označující peptidergní nociceptory (Lallemend & Ernfors, 2012). NP klastr byl rozdělen na základě exprese genů *Mrgprd* (kódující Mas-related G-protein coupled receptor member D) a *P2rx3* (purinoreceptor 3), které označují nepeptidergní nociceptory (Wang & Zylka, 2009). TH klastr, který exprimuje gen pro tyrosinhydroxylasu (*Th*), specificky označující skupinu nemyelinizovaných neuronů (Lallemend & Ernfors, 2012).

Objektivními metodami analýzy hlavních komponent (angl. principal component analysis; PCA) bylo dále opakovaně rozpoznáno pět podskupin neuronů v rámci NF klastru (NF1-NF5), dvě podskupiny PEP1 a PEP2 a tři podskupiny NP klastru (NP1-NP3). Tato

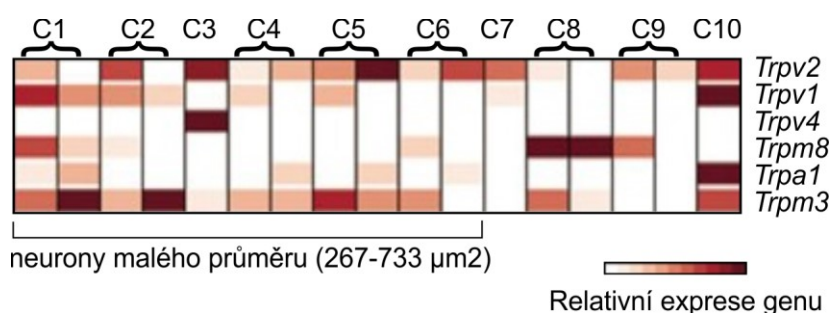
klasifikace v mnohém odpovídá dříve navrženým hypotézám o vývojové souvislosti původu jednotlivých podtypů sensorických neuronů (Lallemend & Ernfors, 2012; Li *et al.*, 2016) a je v souladu s publikovanými funkčními studii.



Obrázek 5: Klasifikace podtypů sensorických neuronů na základě jednobuněčné transkriptomové analýzy. (A) Schematické znázornění sensorického neuronu s vyznačenou oblastí periferního zakončení. (B) „Teplotní mapa“ exprese (relativní počet pozitivních buněk), graficky uspořádaná podle topologie sensorického neuronu zobrazeného v panelu A. Svorkami jsou označeny charakteristické receptory: transientní receptorové potenciálové (TRP), purinoreceptory ionotropní a metabotropní (P2X/Y), receptory pro neuropeptidy (NPR), napětově řízené sodíkové (Na_v) a draslíkové (K_v) kanály, receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA), receptory pro glycin a glutamát (Gly/Glu). Dole vyznačeny jsou reprezentativní geny *Trpa1*, *Trpv1*, *Scn1a* (kódující $Nav1.1$ iontový kanál) a *Kcna1* (kódující $Kv1.1$ kanál). Upraveno podle (Stage *et al.*, 2021; Usoskin *et al.*, 2015).

V roce 2016 byly zkombinovány metody jednobuněčné transkriptomiky s výsledky morfologického a funkčního vyšetření DRG neuronů elektrofyziologickou technikou patch-clamp. Analýza byla cílena na 1745 vybraných genů v DRG neuronech. Využitím metod hierarchického třídění bylo umožněno rozlišit 10 hlavních skupin C1-C10 neuronů

a několik jejich klastrů. C1-C6 obsahovaly neurony malého průměru (průměrná plocha 267-733 μm^2) a zbylé podskupiny obsahovaly velké neurony (779-1257 μm^2). Technikou *in vivo* snímání z celé buňky (tzv. whole-cell konfigurace) byla následně z 69 neuronů vybraných v oblasti L5 snímána aktivita vyvolaná nocicepčním teplem ($> 45^\circ\text{C}$) a nocicepčním chladem ($< 15^\circ\text{C}$). Pomocí kvantitativní qRT-PCR byl stanoven výskyt charakteristických genů umožňující přiřadit neurony příslušné podskupině (Li *et al.*, 2016). Výsledná funkční charakteristika podskupin neuronů z hlediska exprese genů kódujících teplotně citlivé TRP proteiny je zobrazena v Obr. 6.



Obrázek 6: Expresa genů teplotně citlivých TRP receptorů v DRG neuronech v jednotlivých podskupinách určených kombinací metod jednobuněčné transkriptomiky a funkčního vyšetření *in vivo*. Upraveno podle (Li *et al.*, 2016).

6. Modely senzoričkových neuronů odvozené od DRG neuronů

Izolace a kultivace DRG neuronů pro experimentální účely je pracná, časově náročná a nezbytně založená na rutinním využívání živých pokusných zvířat. Získaná populace výsledných senzoričkových neuronů je značně heterogenní a závislá na kultivačních podmínkách. Trvalá snaha o standardizaci experimentů *in vitro* a všeobecné zpřísnění legislativy v oblasti ochrany zvířat proti týrání vedly postupně k vytvoření různých buněčných linií odvozených od DRG neuronů. K přípravě několika linií byl využit proces buněčné immortalizace, při němž buňky získávají neomezený proliferační potenciál. Tento proces spočívá v integraci immortalizačních onkogenů do primárních neuronů. Onkogeny rodiny *myc*, nebo teplotně senzitivní mutant opičího viru (SV40) jsou nejběžněji využívané onkogeny v tomto procesu. Retrovirová transdukcce, která probíhá pomocí infekce geneticky modifikovanými viry, je obecně vhodnější, ale je zapotřebí, aby byly buňky mitoticky velmi aktivní. Neurony, jakožto nedělicí se buňky mohou být transfekovány pomocí netoxických

mutantů virů, například herpes virů, či adenovirů. Buňky transdukované *myc* onkogenem jsou označeny jako kontinuálně se dělící buňky (Honegger, 1999).

Od roku 1985 byly podrobně studovány vlastnosti hybridních buněčných linií F-11 (Platika *et al.*, 1985) a ND7/23 (Wood 1990), myších linií MED17.11, potkaních linií 50B11 a lidských HD10.6 (Raymon *et al.*, 1999). Jedním z důležitých kritérií výběru neuronů s nociceptivní charakteristikou v těchto buněčných liniích je exprese napěťově řízených iontových kanálů určujících průběh AP (Nav1.7, Nav1.8, Kv1.4, Kv4.1, Kv4.3, KCNQ2/3) a klidový potenciál (K2P a Na_v1.9). Vhodnými metodami diferenciací lze u některých linií dosáhnout funkční exprese TRPV1. Přestože na úrovni RNA jsou geny pro teplotně aktivované TRP v různé míře nalezeny, zatím není dostatek experimentální evidence o spolehlivých metodách, kterými lze zajistit jejich funkční expresi na membráně (Yin *et al.*, 2016).

6.1 Linie buněk F-11

Linie buněk F-11 byla vytvořena hybridizací embryonálních ganglií zadních kořenů míšních potkana a myších neuroblastomových buněk N18TG2 (Platika *et al.*, 1985). Tato linie buněk se hojně rozšířila díky schopnosti neuronů vyvolat AP podobný DRG neuronům. V některých studiích bylo prokázáno, že určité diferencované F-11 buňky vykazují pozitivní imunoreaktivitu na substanci P a reagují na kapsaicin (Chiesa *et al.*, 1997; Platika *et al.*, 1985). Tyto buňky se liší od DRG neuronů také v případě proměny glykosfingolipidového profilu při diferenciaci na buňky fenotypově podobné DRG (Ariga *et al.*, 1995). Geny pro TRP receptory jsou v buňkách F-11 zastoupeny v míře odlišné od DRG neuronů. Například *TRPM2* a *TRPM3* jsou jak v DRG neuronech, tak v F-11 myšího genomu obsaženy v hojnějším množství, v F-11 potkaního genomu jsou obsaženy méně. Podobně geny pro receptor TRPV2. Rozdíl mezi linií F-11 a DRG neurony vykazuje také *TRPV3*, který je obsažen v DRG neuronech, ale byla prokázána jeho absence v linii F-11 myšího i potkaního genomu. *TRPA1* je velmi specifický, jelikož se vyskytuje hojně v nativních DRG neuronech, ale málo v myším genomu F-11 a vůbec se nevyskytuje v F-11 v potkaním genomu. Rozdíl byl zjištěn také v genu pro *TRPM8*, jenž se vyskytuje v nativních DRG, ale téměř chybí v obou genomech buněčné linie F-11 (Yin *et al.*, 2016). Nedostatek nebo úplná absence genů pro tyto kanály, jako jedny z nejvýznamnějších termoTRP, velmi omezují využitelnost linie F-11 jako buněčného modelu pro studium teplotně citlivých TRP.

Gene name	DRG	F-11 (mouse)	F-11 (rat)	ND7/23 (mouse)	ND7/23 (rat)
TRPA1	0.108156534	0.000161447	0	0.000113084	0
TRPC5	0.001099483	0.000968679	0.000310206	0.001017754	0.00174703
TRPM2	0.063199902	0.097836616	0.012201427	0.139658487	0.02539017
TRPM3	0.04849941	0.01549887	0.008168752	0.003166346	0.001514093
TRPM8	0.024188622	0.00048434	0.000413608	0	0.000116469
TRPV1	0.194079081	0.000645786	0.000103402	0.000113084	0.000116469
TRPV2	0.101722523	0.202131095	0.031847792	0.133891213	0.032960634
TRPV3	0.000732989	0	0	0	0
TRPV4	0.003013397	0.045850823	0.018198738	0.020694335	0.008269276

Tabulka 3: Relativní exprese genů kódujících teplotně aktivované TRP kanály v DRG neuronech myši a v jednotlivých modelech sensorických neuronů v genomech myši a potkanů (Yin *et al.*, 2016).

6.2 Linie buněk ND7/23

Linie buněk ND7/23 vznikla fúzí buněčné kultury neonatálních DRG neuronů potkana s myšimi neuroblastomovými buňkami N18TG2. Původně byly buňky využívány za účelem studia transportu adenovirového genu zprostředkovaného vektorem. ND7/23 je linie buněk, které jsou svými vlastnostmi podobné linii F-11. Tyto buňky lze podobně jako sensorické neurony aktivovat formaldehydem, algogenní látkou využívanou ke studiu mechanismů akutní nocicepce, na bradykinin však reagují odlišně. Dalším rozdílem je exprese mRNA pro TRP receptory (Tab. 3). U ND7/23 buněk nebyla funkčními experimenty zjištěna signifikantní odpověď na agonisty TRPV1 a TRPA1. Hojněji se u této linie vyskytuje v diferencovaných buňkách mRNA pro TRPC4. Podobně jako u F-11 bylo pro ND7/23 buňky zjištěno, že se tato linie mírou exprese mRNA pro TRPV4, TRPM3, TRPM2 a TRPC5 vyrovná DRG neuronům (Yin *et al.*, 2016). Naproti tomu je zcela odlišná exprese *TRPV3*, *TRPA1* i *TRPM8* v myším i potkaním genomu (Yin *et al.*, 2016).

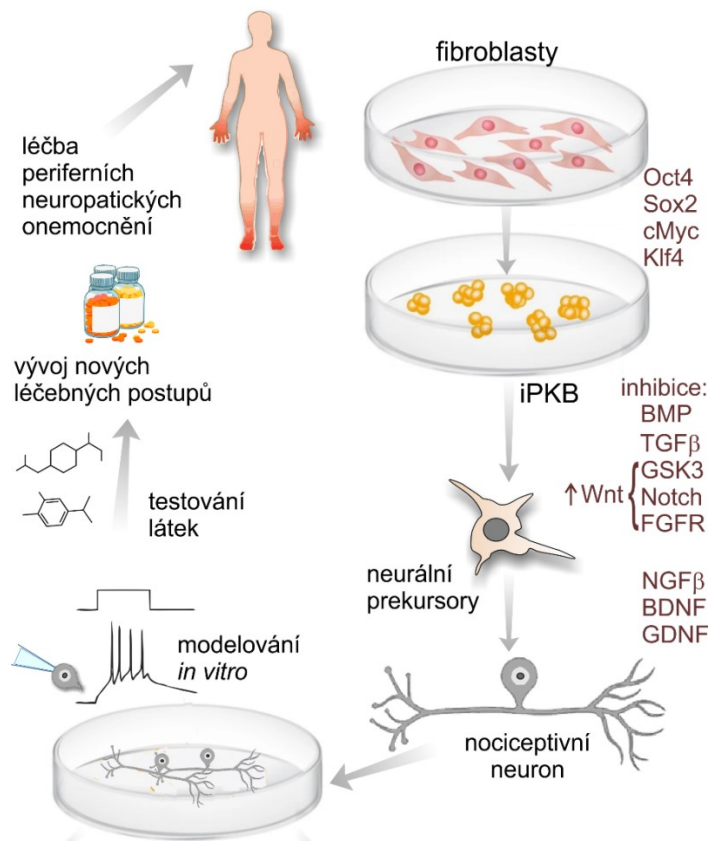
6.3 Sensorické neurony odvozené z pluripotentních kmenových buněk

Základní překážkou, která znesnadňuje translaci výsledků současného experimentálního výzkumu mechanismů nocicepce a bolesti do klinicky využitelných výstupů, je převážné využívání animálních modelů a heterologních expresních systémů. Mezi vlastnostmi myších a lidských sensorických neuronů byly nalezeny významné rozdíly nejen z hlediska morfologie a míry exprese charakteristických proteinů (Rostock *et al.*, 2018; Shiers *et al.*, 2020; Wangzhou *et al.*, 2020), ale také rozdíly mezi funkčními a farmakologickými

vlastnostmi jednotlivých receptorů. Pro některé teplotně citlivé TRP receptory byly odlišnosti natolik výrazné, že napomohly identifikaci důležitých funkčních domén (Bianchi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; De La Roche *et al.*, 2013). Vzhledem k omezené dostupnosti primárních lidských sensorických neuronů je proto ke studiu specifických onemocnění na buněčné a molekulární úrovni nezbytné využití adekvátních modelů lidských neuronů. Jako nejvhodnější přístup jsou v současné době využívány různé techniky přípravy indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPKB), které mohou sloužit nejen ke studiu *in vitro*, ale také potenciálně pro preklinické vyhledávání personalizované léčby pacientů trpících bolestí (Namer *et al.*, 2019). Pro přeprogramování somatických buněk na sensorické neurony jsou nejčastěji používány fibroblasty nebo periferní krevní mononukleární buňky.

Přeprogramování somatických buněk na iPKB vyžaduje přechodnou expresi specifických transkripčních faktorů OCT4 (angl. Octamer-binding Transcription Factor 4), SOX2 (angl. SRY-Box Transcription Factor 2), KLF4 (angl. Kruppel Like Factor 4) a c-MYC (angl. MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor) (Takahashi *et al.*, 2007). K přechodné expresi je nejčastěji využíván plasmid nebo vektor Sendai viru (Okita *et al.*, 2008). Takto epigeneticky přeprogramované buňky zachovávají genetické pozadí, včetně mutací souvisejících s vrozenými onemocněními. Se vzrůstajícím počtem pasáží je somatická paměť buněk resetována (Romito & Cobellis, 2016) a buňky lze dále geneticky editovat technikou CRISPR/Cas9, například za účelem vnesení nebo opravy mutací (Rowe & Daley, 2019). Dřívější metody diferenciaci iPKB byly založeny na selektivním třídění prekursorů buněk neurální lišty podle přítomnosti specifických markerů (Kreitzer *et al.*, 2013). V současné době je nejvíce využívanou metodou přípravy buněčných modelů sensorických neuronů z iPKB indukce pomocí dvou inhibitorů signalizace zprostředkované SMAD. Prvním je LDN-193189, inhibitor kostního morfogenetického proteinu BMP (angl. bone morphogenetic protein). Druhým je SB431542, inhibitor transformujícího růstového faktoru β (TGF β). Následně je aktivována signalizační kaskáda WNT pomocí inhibitorů GSK3 (glykogensynthasa kinasa-3, serin-threoninová proteinkinasa) a signální dráhy Notch a FGF (fibroblastový růstový faktor). Přidání tří neurotrofních faktorů NGF (nervový růstový faktor β), BDNF (angl. brain-derived neurotrophic factor) a GDNF (angl. glia cell-derived neurotrophic factor) k takto diferencovaným buňkám vytvoří peptidergní i nepeptidergní podtypy nociceptorů a po 30 dnech diferenciaci jsou pozorována seskupení podobná gangliím (Lin *et al.*, 2009). Hlavními kritérii úspěšné diferenciaci zralých nociceptorů je povrchová exprese sodných kanálů Nav1.7 a Nav1.8, přítomnost substance P, nebo CGRP, TrkA

(tyrosinkinasový receptor pro neurotrofin) a TRPV1. Elektrofyziologickými technikami lze ověřit funkci indukovaných nociceptorů aplikací adenosintrifosfátu (agonista P2X receptorů), kapsaicinu nebo resiniferatoxinu (agonisté TRPV1) a napětovou aktivací Nav1.8 kanálů, které jsou necitlivé k tetrodotoxinu ($pIC_{50} = 4.2$ na -60 mV) (Woolf & Ma, 2007). Kromě TRPV1 není zatím v literatuře dostatek informací o funkční expresi ostatních teplotně citlivých TRP kanálů. Jsou hledány nové techniky přeprogramování cílené na získání specifických podtypů sensorických neuronů. V nedávné době byla například vyvinuta metoda přeprogramování lidských kmenových buněk na homogenní populaci sensorických neuronů specificky aktivovaných chladem a mechanickými podněty (Nickolls *et al.*, 2020). Bylo prokázáno, že tyto neurony exprimují TRPM8 společně s iontovým kanálem PIEZO2.



Obrázek 7: Příprava indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPKB) a jejich diferenciaci za účelem personalizovaného přístupu k léčbě periferních neuropatických onemocnění. Somatické buňky, např. fibroblasty, jsou přeprogramovány expresí transkripčních faktorů (např. Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc). Ve specifickém diferenciačním médiu jsou iPKB diferencovány na neurální prekursorové buňky a dále na plně diferencované sensorické neurony s nociceptivní charakteristikou. Klinické údaje o konkrétním pacientovi jsou nezbytné pro upřesnění potenciálních in vitro patofyziologických fenotypů, které souvisí s onemocněním. Po identifikaci patofyziologických změn lze provádět průzkum účinku potenciálních léků in vitro a vyhledávat nové možnosti léčby v závislosti na specifickém typu bolestivého onemocnění pacienta. Upraveno podle (Borger *et al.*, 2017; Lampert *et al.*, 2020).

7. Závěr

Navzdory intenzivnímu výzkumu dosud neexistuje pro některé závažné formy periferních neuropatických onemocnění uspokojivě účinná léčba. Základní výzkum buněčné a molekulární podstaty vzniku chronické a neuropatické bolesti byl v posledních několika desetiletích nebyvale katalyzován rozvojem moderních elektrofyziologických, zobrazovacích a genetických technik spolu s rozšířením vysoce propustných systémů pro vyhledávání účinných látek. Ukazuje se, že pro přesné zacílení látek se specifickým působením jsou zvířecí modely nedostačující a pro vyhledávání nových terapeutických přístupů *in vitro* je nezbytné využití více relevantních buněčných modelů. Limitovaná dostupnost lidských senzorických neuronů určených pro experimentální účely a zejména technický a legislativní pokrok v oblasti výzkumu kmenových buněk zaměřují pozornost současného výzkumu na buněčné modely odvozené z lidských somatických buněk a mononukleárních buněk periferní krve. O důležitém translačním potenciálu tohoto přístupu není pochyb, výzkum v tomto směru je však zatím spíše v začátcích. V databázi *ClinicalTrials.gov* jsou například evidovány dosud jen čtyři studie zaměřené na studium možného využití indukovaných pluripotentních kmenových buněk pro pochopení mechanismů vzniku závažných neuropatických onemocnění u lidí (NCT02564484, NCT02696746 NCT03722303 a NCT01953159; přístup 20.4.2021). Z výsledků základního výzkumu je však již v současné době patrné, že kromě přesné znalosti vlastností teplotně citlivých TRP kanálů, je nezbytná přesná charakterizace úlohy řady dalších iontových kanálů a receptorů, které patří mezi hlavní identifikátory jednotlivých podtypů nociceptivních neuronů a určují jejich excitabilitu za normálních a patofyziologických podmínek. Cesta k personalizované léčbě bolesti bude vyžadovat ještě mnoho vědeckých poznatků, první úspěšné kroky (např. Namer *et al.* 2019) však již svědčí o schůdném a perspektivním směru výzkumu.

8. Použitá literatura

(*Review)

- Abe, J., Hosokawa, H., Okazawa, M., Kandachi, M., Sawada, Y., Yamanaka, K., Matsumura, Abe, J., Hosokawa, H., Okazawa, M., Kandachi, M., Sawada, Y., Yamanaka, K., Matsumura, K., & Kobayashi, S. (2005). TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Molecular Brain Research*, 136(1–2), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.01.013>
- *Alexander, S. P. H., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., Aldrich, R. W., Becirovic, E., Biel, M., Catterall, W. A., Conner, A. C., Davies, P., Zhu, M. *et al.* (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 176(S1), S142–S228. <https://doi.org/10.1111/bph.14749>
- Andersson, D. A., Adner, M., Högestätt, E. D., & Zygmunt, P. M. (2002). Mechanisms underlying tissue selectivity of anandamide and other vanilloid receptor agonists. *Molecular Pharmacology*, 62(3), 705–713. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.705>
- Ariga, T., Blaine, G. M., Yoshino, H., Dawson, G., Kanda, T., Zeng, G. C., Kasama, T., Kushi, Y., & Yu, R. K. (1995). Glycosphingolipid Composition of Murine Neuroblastoma Cells: O-Acetyltransferase Gene Downregulates the Expression of O-Acetylated GD3. *Biochemistry*, 34(36), 11500–11507. <https://doi.org/10.1021/bi00036a024>
- Baccaglini, P. I., & Hogan, P. G. (1983). Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(2 I), 594–598. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.2.594>
- 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)
- Bang, S., Kim, K. Y., Yoo, S., Lee, S. H., & Hwang, S. W. (2007). Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neuroscience Letters*, 425(2), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.08.035>
- Barabas, M. E., Kossyryeva, E. A., & Stucky, C. L. (2012). TRPA1 Is Functionally Expressed Primarily by IB4-Binding, Non-Peptidergic Mouse and Rat Sensory Neurons. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047988>
- *Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- 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. *et al.* (2021). Odontoblast TRPC5 channels signal cold pain in teeth. *Science Advances*, 7(13). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf5567>

- Bianchi, B. R., Zhang, X. F., Reilly, R. M., Kym, P. R., Yao, B. B., & Chen, J. (2012). Species comparison and pharmacological characterization of human, monkey, rat, and mouse TRPA1 channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *341*(2), 360–368. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.189902>
- *Borger, D. K., McMahon, B., Lal, T. R., Serra-Vinardell, J., Aflaki, E., & Sidransky, E. (2017). Induced pluripotent stem cell models of lysosomal storage disorders. *Disease Models and Mechanisms*, *10*(6), 691–704. <https://doi.org/10.1242/dmm.029009>
- 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*, *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*, *389*(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- *Cervero, F., & Laird, J. M. A. (1999). Visceral pain. *Lancet*, *353*(9170), 2145–2148. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01306-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01306-9)
- Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J. O., Sun, C., Walter, K., Yao, B., & Kim, D. (2013). Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3501>
- Cheng, W., Yang, F., Takanishi, C. L., & Zheng, J. (2007). Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *Journal of General Physiology*, *129*(3), 191–207. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709731>
- Chiesa, N., Rosati, B., Arcangeli, A., Olivotto, M., & Wanke, E. (1997). A novel role for HERG K⁺ channels: Spike-frequency adaptation. *Journal of Physiology*, *501*(2), 313–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.313bn.x>
- Chiu, I. M., Barrett, L. B., Williams, E. K., Strochlic, D. E., Lee, S., Weyer, A. D., Lou, S., Bryman, G. S., Roberson, D. P., Ghasemlou, N., Piccoli, C., Ahat, E., Wang, V., Cobos, E. J., Stucky, C. L., Ma, Q., Liberles, S. D., & Woolf, C. J. (2014). Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity. *ELife*, *3*. <https://doi.org/10.7554/eLife.04660>
- *Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(6), 387–396. <https://doi.org/10.1038/35077544>
- Cuypers, E., Yanagihara, A., Karlsson, E., & Tytgat, J. (2006). Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Letters*, *580*(24), 5728–5732. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.030>
- De La Roche, J., Eberhardt, M. J., Klinger, A. B., Stanslowsky, N., Wegner, F., Koppert, W., Reeh, P. W., Lampert, A., Fischer, M. J. M., & Leffler, A. (2013). The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(28), 20280–20292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479337>
- *Djoughri, L. (2016). A δ -fiber low threshold mechanoreceptors innervating mammalian hairy skin: A review of their receptive, electrophysiological and cytochemical properties in

- relation to A δ -fiber high threshold mechanoreceptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 61, 225–238. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.12.009>
- *Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- *Dussor, G., & Cao, Y. Q. (2016). TRPM8 and Migraine. *Headache*, 56(9), 1406–1417. <https://doi.org/10.1111/head.12948>
- Fang, X., Djouhri, L., McMullan, S., Berry, C., Waxman, S. G., Okuse, K., & Lawson, S. N. (2006). Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *The Journal of Neuroscience*, 26(27), 7281–7292. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1072-06.2006>
- Gattkowsky, E., Johnsen, A., Bauche, A., Möckl, F., Kulow, F., Garcia Alai, M., Rutherford, T. J., Fliegert, R., & Tidow, H. (2019). Novel CaM-binding motif in its NudT9H domain contributes to temperature sensitivity of TRPM2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(7), 1162–1170. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.010>
- *Gebhart, G. F. (2000). Visceral pain - Peripheral sensitisation. *Gut*, 47(4), 54–56. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv54
- *González-Ramírez, R., Chen, Y., Liedtke, W. B., & Morales-Lázaro, S. L. (2019). TRP Channels and Pain. *Neurobiology of TRP Channels*, 125–148. <https://doi.org/10.4324/9781315152837-8>
- *Gracheva, E. O., & Bagriantsev, S. N. (2015). Evolutionary adaptation to thermosensation. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.021>
- Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., & Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6408–6414. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-15-06408.2002>
- *Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. *Brain Research Reviews*, 48(3), 457–476. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>
- *Hoffstaetter, L. J., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2018). TRPs *et al.*: a molecular toolkit for thermosensory adaptations. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 470(5), 745–759. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2120-5>
- *Honegger, P. (1999). Overview of Cell and Tissue Culture Techniques. *Current Protocols in Pharmacology*, 4(1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1201s04>
- Hu, H. Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C. K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L. Y., Wood, J. D., & Zhu, M. X. (2004). 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35741–35748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404164200>
- Ichikawa, H., & Sugimoto, T. (2000). Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience*, 101(3), 719–725. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00427-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00427-9)

- Jaquemar, D., Schenker, T., & Trueb, B. (1999). An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7325–7333. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7325>
- *Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>
- 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), 1273–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808487106>
- Kitchener, P. D., Wilson, P., & Snow, P. J. (1993). Selective labelling of primary sensory afferent terminals in lamina II of the dorsal horn by injection of *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 into peripheral nerves. *Neuroscience*, 54(2), 545–551. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90274-J](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90274-J)
- Knowlton, W. M., Palkar, R., Lippoldt, E. K., Mccoy, D. D., Baluch, F., Chen, J., & Mckemy, D. D. (2013). A Sensory-Labeled Line for Cold: TRPM8-Expressing Sensory Neurons Define the Cellular Basis for Cold, Cold Pain, and Cooling-Mediated Analgesia. *The Journal of Neuroscience*, 33(7), 2837–2848. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1943-12.2013>
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., & Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ /C-fibers and colocalization with Trk receptors. *Journal of Comparative Neurology*, 493(4), 596–606. <https://doi.org/10.1002/cne.20794>
- Kreitzer, F. R., Salomonis, N., Sheehan, A., Huang, M., Park, J. S., Spindler, M. J., Lizarraga, P., Weiss, W. A., So, P. L., & Conklin, B. R. (2013). A robust method to derive functional neural crest cells from human pluripotent stem cells. *American Journal of Stem Cells*, 2(2), 119–131.
- *Lallemend, F., & Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends in Neurosciences*, 35(6), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.006>
- *Lampert, A., Bennett, D. L., McDermott, L. A., Neureiter, A., Eberhardt, E., Winner, B., & Zenke, M. (2020). Human sensory neurons derived from pluripotent stem cells for disease modelling and personalized medicine. *Neurobiology of Pain*, 8, 100055. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2020.100055>
- Laursen, W. J., Schneider, E. R., Merriman, D. K., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2016). Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11342–11347. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604269113>
- *Lewin, G. R., & Moshourab, R. (2004). Mechanosensation and pain. *Journal of Neurobiology*, 61(1), 30–44. <https://doi.org/10.1002/neu.20078>
- Li, C. L., Li, K. C., Wu, D., Chen, Y., Luo, H., Zhao, J. R., Wang, S. S., Sun, M. M., Lu, Y. J., Zhong, Y. Q., Hu, X. Y., Hou, R., Zhou, B. B., Bao, L., Xiao, H. S., & Zhang, X. (2016). Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-

- sequencing and functional heterogeneity. *Cell Research*, 26(1), 83–102. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.149>
- Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., AndrejŠali, Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., & Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103(3), 525–535. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00143-4)
- Liedtke, W., & Friedman, J. M. (2003). Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13698–13703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735416100>
- Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H. S., Hao, E., Hayek, A., & Ding, S. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature Methods*, 6(11), 805–808. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1393>
- Liu, B., & Qin, F. (2017). Single-residue molecular switch for high-temperature dependence of vanilloid receptor TRPV3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), 1589–1594. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615304114>
- Lynch, V. J., Bedoya-Reina, O. C., Ratan, A., Sulak, M., Drautz-Moses, D. I., Perry, G. H., Miller, W., & Schuster, S. C. (2015). Elephantid Genomes Reveal the Molecular Bases of Woolly Mammoth Adaptations to the Arctic. *Cell Reports*, 12(2), 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.027>
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
- Mecklenburg, J., Zou, Y., Wangzhou, A., Garcia, D., Lai, Z., Tumanov, A. V., Dussor, G., Price, T. J., & Akopian, A. N. (2020). Transcriptomic sex differences in sensory neuronal populations of mice. *Scientific Reports*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72285-z>
- *Melli, G., & Höke, A. (2009). Dorsal root ganglia sensory neuronal cultures: A tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4(10), 1035–1045. [Expert Opin Drug Discov. https://doi.org/10.1517/17460440903266829](https://doi.org/10.1517/17460440903266829)
- *Millan, M. J. (1999). The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3)
- *Montell, C., Birnbaumer, L., & Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108(5), 595–598. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00670-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00670-0)
- Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S. R., Andahazy, M., Story, G. M., & Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, 307(5714), 1468–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1108609>
- Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G., & García-Añoveros, J. (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *Journal of Neuroscience*, 25(16), 4052–4061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005>

- Namer, B., Schmidt, D., Eberhardt, E., Maroni, M., Dorfmeister, E., Kleggetveit, I. P., Kaluza, L., Meents, J., Gerlach, A., Lin, Z., Winterpacht, A., Dragicovic, E., Kohl, Z., Schüttler, J., Kurth, I., Warncke, T., Jorum, E., Winner, B., & Lampert, A. (2019). Pain relief in a neuropathy patient by lacosamide: Proof of principle of clinical translation from patient-specific iPS cell-derived nociceptors. *EBioMedicine*, *39*, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.042>
- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P. D., & Caterina, M. J. (2003). TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *Journal of Neurophysiology*, *90*(1), 515–520. <https://doi.org/10.1152/jn.00843.2002>
- Nickolls, A. R., Lee, M. M., Espinoza, D. F., Szczot, M., Lam, R. M., Wang, Q., Beers, J., Zou, J., Nguyen, M. Q., Solinski, H. J., AlJanahi, A. A., Johnson, K. R., Ward, M. E., Chesler, A. T., & Bönnemann, C. G. (2020). Transcriptional Programming of Human Mechanosensory Neuron Subtypes from Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, *30*(3), 932–946.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.062>
- *Nilius, B., & Bíró, T. (2013). TRPV3: A “more than skinny” channel. *Experimental Dermatology*, *22*(7), 447–452. <https://doi.org/10.1111/exd.12163>
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, *322*(5903), 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1164270>
- *Olson, W., Dong, P., Fleming, M., & Luo, W. (2016). The specification and wiring of mammalian cutaneous low-threshold mechanoreceptors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *5*(3), 389–404. <https://doi.org/10.1002/wdev.229>
- *Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., & Nilius, B. (2006). Permeation and selectivity of TRP channels. *Annual Review of Physiology*, *68*, 685–717. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
- Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S. N., Koltzenburg, M., & Caterina, M. J. (2011). TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *Journal of Neuroscience*, *31*(32), 11425–11436. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1384-09.2011>
- 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)
- Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2002). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*, *296*(5575), 2046–2049. <https://doi.org/10.1126/science.1073140>
- Perraud, A. L., Takanishi, C. L., Shen, B., Kang, S., Smith, M. K., Schmitz, C., Knowles, H. M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., Stoddard, B. L., & Scharenberg, A. M. (2005). Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(7), 6138–6148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411446200>

- Platika, D., Boulos, M. H., Baizer, L., & Fishman, M. C. (1985). Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), 3499–3503. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3499>
- Qin, N., Neeper, M. P., Liu, Y., Hutchinson, T. L., Lubin, M. Lou, & Flores, C. M. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(24), 6231–6238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008>
- * Raymon, H. K., Thode, S., Zhou, J., Friedman, G. C., Pardinas, J. R., Barrere, C., Johnson, R. M., and Sah, D. W. (1999) Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. *Journal of Neuroscience*, 19, 5420-5428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-13-05420.1999>
- *Romito, A., & Cobellis, G. (2016). Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. *Stem Cells International*, 2016:9451492. <https://doi.org/10.1155/2016/9451492>
- Rostock, C., Schrenk-Siemens, K., Pohle, J., & Siemens, J. (2018). Human vs. Mouse Nociceptors – Similarities and Differences. *Neuroscience*, 387, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.047>
- *Rowe, R. G., & Daley, G. Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. In *Nature Reviews Genetics*, 20(7), 377–388. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0100-z>
- Sheahan, T. D., Valtcheva, M. V., McIlvried, L. A., Pullen, M. Y., Baranger, D. A. A., & Gereau, R. W. (2018). Metabotropic glutamate receptor 2/3 (mGluR2/3) activation suppresses TRPV1 sensitization in mouse, but not human, sensory neurons. *ENeuro*, 5(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0412-17.2018>
- Shiers, S., Ray, P. R., Wangzhou, A., Sankaranarayanan, I., Tatsui, C. E., Rhines, L. D., Li, Y., Uhelski, M. L., Dougherty, P. M., & Price, T. J. (2020). ACE2 and SCARF expression in human dorsal root ganglion nociceptors: implications for SARS-CoV-2 virus neurological effects. *Pain*, 161(11), 2494–2501. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002051>
- Siemens, J., Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E. A., Basbaum, A. I., King, D., & Julius, D. (2006). Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*, 444(7116), 208–212. <https://doi.org/10.1038/nature05285>
- Smith, G. D., Gunthorpe, M. J., Kelsell, R. E., Hayes, P. D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J. E., Jerman, J. C., Walhin, J. P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K. J., Smart, D., Randall, A. D., Anand, P., & Davis, J. B. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*, 418(6894), 186–190. <https://doi.org/10.1038/nature00894>
- *Stage, T. B., Hu, S., Sparreboom, A., & Kroetz, D. L. (2021). Role for Drug Transporters in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Clinical and Translational Science*, 14(2), 460–467. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cts.12915>
- Ständer, S., Augustin, M., Roggenkamp, D., Blome, C., Heitkemper, T., Worthmann, A. C., & Neufang, G. (2017). Novel TRPM8 agonist cooling compound against chronic itch:

- results from a randomized, double-blind, controlled, pilot study in dry skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(6), 1064–1068. <https://doi.org/10.1111/jdv.14041>
- Staruschenko, A., Jeske, N. A., & Akopian, A. N. (2010). Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15167–15177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106153>
- 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)
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Tan, C.-H., & Mcnaughton, P. A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536, 460-463. <https://doi.org/10.1038/nature19074>
- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., & Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO Journal*, 25(9), 1804–1815. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601083>
- 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)
- Tóth, B., & Csanády, L. (2012). Pore collapse underlies irreversible inactivation of TRPM2 cation channel currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13440–13445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204702109>
- Uosokin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P. V., Linnarsson, S., & Ernfors, P. (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 18(1), 145–153. <https://doi.org/10.1038/nn.3881>
- Vandewauw, I., De Clercq, K., Mulier, M., Held, K., Pinto, S., Van Ranst, N., Segal, A., Voet, T., Vennekens, R., Zimmermann, K., Vriens, J., & Voets, T. (2018). A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature*, 555(7698), 662–666. <https://doi.org/10.1038/nature26137>
- Vlachová, V., Teisinger, J., Sušánková, K., Lyfenko, A., Etrich, R., & Vyklický, L. (2003). Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *Journal of Neuroscience*, 23(4), 1340–1350. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-04-01340.2003>
- *Vriens, J., Nilius, B., & Voets, T. (2014). Peripheral thermosensation in mammals. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(9), 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>
- Wagner, T. F. J., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Düfer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S. E., & Oberwinkler, J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1421–1430. <https://doi.org/10.1038/ncb1801>
- Wang, H., & Zylka, M. J. (2009). Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(42), 13202–13209. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3248-09.2009>
- Wangzhou, A., McIlvried, L. A., Paige, C., Barragan-Iglesias, P., Shiers, S., Ahmad, A., Guzman, C. A., Dussor, G., Ray, P. R., Gereau, R. W., & Price, T. J. (2020). Pharmacological target-focused transcriptomic analysis of native vs cultured human and mouse dorsal root ganglia. *Pain*, 161(7), 1497–1517. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001866>
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., & Nilius, B. (2002). Heat-evoked Activation of TRPV4 Channels in a HEK293 Cell Expression System and in Native Mouse Aorta Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47044–47051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208277200>
- 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 351(2), 259–269. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.216010>
- *Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, 55(3), 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.016>
- Xia, S., Wang, L., Fu, T. M., & Wu, H. (2019). Mechanism of TRPM2 channel gating revealed by cryo-EM. *FEBS Journal*, 286(17), 3333–3339. <https://doi.org/10.1111/febs.14939>
- Xu, H., Delling, M., Jun, J. C., & Clapham, D. E. (2006). Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neuroscience*, 9(5), 628–635. <https://doi.org/10.1038/nn1692>
- Yin, K., Baillie, G. J., & Vetter, I. (2016). Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Molecular Pain*, 12, 1–17. <https://doi.org/10.1177/1744806916646111>
- *Zeilhofer, H. U. (2005). Synaptic modulation in pain pathways. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 154, 73–100. <https://doi.org/10.1007/s10254-005-0043-y>
- Zhong, Z., Zhai, Y., Liang, S., Mori, Y., Han, R., Sutterwala, F. S., & Qiao, L. (2013). TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2608>
- 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>

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H. H., Sörgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, *400*(6743), 452–457. <https://doi.org/10.1038/22761>