

Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta

Fyzikální ústav UK

Ke Karlovu 5, CZ-121 16 Praha 2

E-mail: ibarvik@karlov.mff.cuni.cz

Posudek školitele na disertační práci Mgr. Vlastimila Zímy
Molecular dynamics simulations of ion channel TRPA1

Disertační práce je zaměřena na iontový kanál TRPA1, který patří do rodiny 27 TRP kanálů, které jsou zodpovědné za naše vnímání bolesti. Nacházejí se v tzv. nociceptivních neuronech a jsou schopné vyvolat změnu membránového potenciálu dostatečnou na to, aby stimulovala otevření sodíkových kanálů a v konečném výsledku vytvoření akčního potenciálu putujícího po axonu neuronu. Od ostatních iontových kanálů se podobně TRP kanály odlišují rozmanitostí podnětů, na jejichž působení i synergické působení jsou schopny reagovat (teplota, membránový potenciál, ionty, ligandy vážící se kovalentně i nekovalentně atd.). Výzkum TRP kanálů je velmi aktuální. Je motivován snahou o vývoj léků proti chronické bolesti, které by představovaly alternativu k opiátům, jejichž užívání má řadu negativních účinků, vyvolává závislost a případné předávkování může mít i fatální následky. Je proto potřeba dokonale poznat strukturu iontových TRP kanálů, porozumět mechanismům jejich otevírání a zavírání, nalézt aminokyseliny, které podobně tímto procesem výrazně modifikuji konformaci svých postranních řetězců a jejichž zafixování pomocí malých ligandů by daný iontový kanál mohlo zablokovat v zavřeném nebo desenzitizovaném stavu. Z hlediska specifity působení a snížení rizika vedlejších efektů je podobně vhodné zaměřit se nikoliv na centrální oblast póru, ale na periferní sensorové domény, cytoplazmatické konce nebo extracelulární klíčky, kde jsou mezi jednotlivými TRP kanály výrazné rozdíly.

S myšlenkou navázat spolupráci s Fyziologickým ústavem (konkrétně se skupinou RNDr. Viktorie Vlachové, DrSc.) a zabývat se prostřednictvím počítačového modelování iontovým kanálem TRPA1 přišel sám Mgr. Vlastimil Zíma v době, kdy se jednalo o velmi ambiciózní záměr. A to z jakéhokoliv úhlu pohledu.

Výpočetní technika (nejen naše) byla příliš pomalá pro smysluplné MD simulace tak velkých simulovaných systémů, jako jsou tetramery TRP kanálů sestávající z několika tisíc aminokyselin, které jsou zanořené ve fragmentu buněčné membrány a obklopené vodní obálkou. Navíc v té době nebyla dostupná krystalová struktura žádného TRP kanálu. Existovaly pouze struktury periferních iontových kanálů, které mohly posloužit jako šablony pro homologní modelování transmembránových částí TRP kanálů. Nicméně pro modelování extracelulárních klíčků a dlouhých cytoplazmatických N- a C-konců nebyla opora. Kvalita tehdejších silových polí podobně nebyla dostatečná na to, aby bylo možné simulovat folding částí proteinů nebo alespoň krátkých peptidů pomocí molekulárně-dynamických simulací. Nicméně rozumím jsem tomu, že Mgr. Vlastimil Zíma má i jistou osobní motivaci vnovat se právě tomuto tématu a předpokládám, že kde je vlna, tam se objeví i cesta. Což se brzy začalo naplňovat.

Mgr. Vlastimil Zíma získal grant od GAUK, díky němuž postupně vybudoval malý PC klastr osazený výpočetními grafickými kartami, které v té době umožnily skokové prodloužení délky MD trajektorií z jednotek nanosekund až na jednotky mikrosekund. V literatuře se podobně v té době začaly objevovat výsledky výpočtů získané pomocí specializovaného superpočítače ANTON, s nímž je možné pro biomolekulární systémy naakumulovat až milisekundové trajektorie. To otevřelo

cestu k rozhodující revizi silových polí umožňující simulovat folding peptid a posléze i menších protein. Kromě toho byla pomocí superpočítače ANTON provedena MD simulace gatingu napětím ovládaného iontového kanálu struktury blízkého TRP kanálu, což pro nás představovalo cenné vodítko. Zejména ale došlo k neočekávaným pokrokům v oblasti elektronové mikroskopie, přičemž TRP kanály jsou někdy zmiňovány jako skupina molekul, která z tohoto průlomového objevu profitovala zejména nejvíce. V roce 2013 se v proteinové databázi objevily první struktury kanálu TRPV1, v roce 2015 neúplná struktura zavřeného kanálu TRPA1 a poté i desítky dalších struktur.

Teoretická část předkládané práce začíná popisem struktury a funkce iontových kanálů, včetně NaV a KV kanálů, které jsou s TRP kanály funkčně svázané a které zejména v pozdějších fázích řešení práce sloužily jako šablony při tvorbě tzv. homologních modelů. Poté následuje literární přehled studií zaměřených na molekulární dynamické simulace membrán, membránových proteinů a iontových kanálů, které musel Mgr. Vlastimil Zíma pečlivě nastudovat, aby mohl správně zvolit například silová pole a vhodné simulační parametry. Do té doby jsme se totiž téměř výhradně zaměřovali na simulace menších biomolekulárních komplexů obsahujících nukleové kyseliny.

V metodické části práce jsou popsány základy metod, které se uplatnily při řešení práce. Jednalo se zejména o molekulární dynamiku, homologní modelování, flexibilní fitování struktur do map elektronové hustoty, výpočty relativní vazebné volné energie ligand-prostřednictvím tzv. alchymistických výpočtů, popř. výpočty profilu volné energie při průchodu iontu pórem iontového kanálu. Na konci metodické kapitoly lze také nalézt výčet softwaru, který vytvořil sám Mgr. Vlastimil Zíma a který slouží k usnadnění přípravě simulovaných systémů, provádění MD simulací a analýze jejich výsledků. Tento software Mgr. Vlastimil Zíma opatřil dokumentací a dal volně k dispozici výpočetní komunitě. V našem případě to nepochybně významně usnadní život studentům, kteří budou na jeho práci navazovat.

Cílem práce bylo prostřednictvím počítačového modelování určit aminokyseliny, jejichž funkční důležitost by bylo možné posléze ověřit prostřednictvím experimentu – bodových mutací a elektrofyziologických měření. V literatuře přitom neexistoval návod i vodítko, jak k tomuto úkolu optimálně postupovat. U příbuzných a mnohem lépe prostudovaných NaV a KV kanálů ovládaných napětím, je mechanismus jejich otevírání a zavírání přezřetelně jednoduchý. Závisí na pohybu helixu S4 s několika základními aminokyselinami v senzorní doméně S1-S4. Naproti tomu TRP kanály jsou aktivovány různými způsobem mnoha drobných podjednotkami v kterékoliv části jejich struktury. Proto bylo obvykle potřeba nejprve provést sekvenční alignment kanálu TRPA1 a šablonové struktury a určit potenciálně důležitou oblast. Poté byl proveden sekvenční alignment této oblasti v rámci 27 lidských TRP kanálů i v rámci TRPA1 kanálů z nejrůznějších organismů. To obvykle umožnilo nalézt evolučně konzervované a tudíž i potenciálně funkčně důležité aminokyseliny. Vzhledem k tomu, že struktura kanálu TRPA1 v první fázi řešení práce vůbec neexistovala a i poté, co se stala dostupnou, jsme se zaměřovali na tyto oblasti, které v ní rozřešeny nebyly, bylo obvykle dále potřeba použít tzv. homologní modelování. Následné molekulární-dynamické simulace pak umožnily postihnout, zda postranní i zce vytipovaných aminokyselin mohou plnit předpokládanou funkci. Poté obvykle následovalo několik kol experimentů prováděných ve FgU, a jejich interpretace pomocí počítačového modelování.

Na počátku řešení této práce se Mgr. Vlastimil Zíma podílel na tvorbě dvou pohledových snímků o iontovém kanálu TRPA1.

1. Jedním z podnětů, který z těchto prací vyplynul, byla velmi komplexní regulace kanálu TRPA1 pomocí vápníkových iontů. Ty nejprve stimulují otevření kanálu, poté jsou ale zodpovědné i za jeho uzavření. Analýza aminokyselinové sekvence kanálu TRPA1 umožnila nalézt na jeho C-konci klastr acidických aminokyselin. Molekulární dynamické simulace homologního modelu potenciálního vazebného místa i jeho mutantů umožnily určit konkrétní aminokyseliny zodpovědné za vazbu vápníkového iontu, což experimentálně následně potvrdil.

2. Dalším podnětem, který při tvorbě úvodních pohledových snímků vyplynul, byla skutečnost, že jediná bodová mutace N855S iontového kanálu TRPA1 vyvolává u lidí epizodické záchvaty bolesti. Na základě počítačového modelování Mgr. Vlastimil Zíma předpokládá, že klíčovou úlohu by při tom mohl hrát tzv. solný mostek E854-K868 (tj. interakce opačně nabitých aminokyselin - v tomto případě situovaných v sousedních monomerech kanálu TRPA1). Solné mostky E854-K868 se totiž tvořily v bezprostřední blízkosti klíčové aminokyseliny N855 a případná mutace N855S by měla jejich tvorbu výrazně usnadňovat. V experimentu mutace jednotlivých aminokyselin E854 a K868 narušovaly funkci kanálu TRPA1. Současné mutace obou aminokyselin obracející jejich náboj (E854R a K868E), jež v principu oproti dovolovaly tvorbu solného mostku, vedly k tvorbě funkčního kanálu.

3. Když se v proteinové databázi objevily struktury otevřeného iontového kanálu TRPV1 a zavřeného iontového kanálu TRPA1, byl prostřednictvím metody MDFF (tj. molekulární-dynamického flexibilního fitování) vytvořen model otevřeného TRPA1. Ten umožnil určit několik aminokyselin na rozhraní centrální části s pórem S5-S6 a sensorové domény S1-S4, které by mohly být důležité pro otevírání a zavírání iontového kanálu. Kromě toho model vedl k upnutí naší pozornosti na oblast extracelulární kličky S1-S2, jež byla ve struktuře TRPA1 3J9P nerozřešena. Následné extenzivní MD simulace foldingu kličky S1-S2 vedly k nalezení jejích dvou konformerů, které byly v souladu s mapou elektronové hustoty a umožnily určit jako potenciálně funkčně důležité i některé hydrofobní aminokyseliny. Kromě toho byly provedeny ještě MD simulace komplexu TRPA1 s toxinem, o němž je známo, že má vliv na funkci tohoto iontového kanálu. Experimentálně potvrdil zásadní úlohu vytipovaných aminokyselin pro gating TRPA1 a navíc odhalil, že vápníkové ionty mohou TRPA1 blokovat interakcí s aminokyselinami v oblasti póru.

4. Z experimentu bylo známo, že jediná bodová mutace R852E má značný dopad na regulaci TRPA1 vápníkem. Struktura TRPA1 3J9P ukázala, že postranní řetězec R852 míří do nitra sensorové domény S1-S4, jež však zůstala z velké části nerozřešena. Struktury ostatních TRP kanálů však umožnily vytvořit v rozhodný model sensorové domény a určit potenciálně funkčně důležité polární aminokyseliny mířící do jejího nitra. Přítomnost několika základních aminokyselin stimulovala zkoumání elektrostatického potenciálu uvnitř sensorové domény a v konečném výsledku vedla k vytvoření hypotézy o vazbě fosfolipidu PIP2 do jejího nitra. I tyto předikce byly následně experimentálně potvrzeny.

5. V poslední publikované studii byl zkoumán potenciál spojení molekulárně-dynamických simulací, ab initio výpočtů a vibrační spektroskopie pro určení konformačních preferencí peptidů. Což z hlediska TRP kanálů může být užitečné v případě některých extracelulárních a cytoplazmatických kliček, jež v cryoEM strukturách zůstávají často nerozřešeny.

6. A kolik jsou v proteinové databázi nyní již dostupné desítky struktur TRP kanálů, jen málokterá z nich zachycuje otevřený stav. V některých případech bylo

otev ení kanál dosaženo prost ednictvím mutací a je sporné, nakolik je pak výsledek ještě relevantní pro nemutované kanály. V n kterých dalších p ípadech z stává po posouzení statických struktur diskutabilní, zda jsou ještě uzav ené i již pootev ené nebo dokonce pln otev ené. Mgr. Vlastimil Zíma proto provedl adu výpo t profilu volné energie p í pr chodu iontu pórem r zných TRP kanál s cílem ur it jejich stav a vyvodit záv ry relevantní pro TRPA1. Malá ást výsledk t chto výpo t , ve kterých stále pokračujeme, byla zahrnuta do disertace.

7. Podobn je v poslední výsledkové kapitole disertace zahrnuta ást pilotních výpo t relativní vazebné volné energie ligand do senzoru iontového kanálu, jejichž smyslem bylo ur it, pro jak rozdílné ligandy je metoda ještě schopna poskytnout alespo kvalitativn správné výsledky.

V rámci diserta ní práce byla pomocí prost edk po íta ového modelování systematicky studována struktura iontového kanálu TRPA1 a byla nalezena celá ada funk n potenciáln d ležitých aminokyselin (na jeho C-konci, v extracelulární i cytoplazmatické ásti sensorové domény i v oblasti S4-S5 spojující sensorové domény s centrálním pórem). Predikce byly následn ov eny prost ednictvím bodových mutací a elektrofyziologických m ení na spolupracujícím pracovišti ve Fyziologickém ústavu AV R. Získané výsledky se staly základem pro 7 publikací (z toho 5 v zahrani ních impaktovaných asopisech) a 15 konferen ních p ísp vk . Je tedy z ejmé, že Mgr. Vlastimil Zíma dokázal svou po áte ní vizi pln realizovat. Prokázal p ítom zna nou samostatnost a vytrvalost a vše ještě dokázal skloubit s pé í o rozr stající se rodinu, v etn nap . toho, že se s životní partnerkou (která paraleln provád la velkou ást experiment ve FgU) prost ídal na mate ské dovolené. Za navázání a rozvoj spolupráce se skupinou RNDr. Viktorie Vlachové, DrSc. ve FgU jsem Mgr. Vlastimilu Zímovi velmi vd ný. Stejn tak jsem mu vd ný za správu výpo etního klastru, po íta v PC laborato i, tvorbu a administraci webových stránek celého Fyzikálního ústavu atd.

Vzhledem ke všemu výše uvedenému, celkové úrovni práce, rozsahu a významu dosažených výsledk , které byly publikované v zahrani ních impaktovaných asopisech, doporu uji p íjetí diserta ní práce k obhajob .

V Praze, dne 7.9. 2018

RNDr. Ivan Barvík, PhD.