

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program:



Mgr. Jan Bílý

Charakterizace vazebných míst na intracelulárních koncích TRPC6
receptoru pro kalmodulin a S100A1

*Identification of the binding sites on transient receptor potential cation channel TRPC6
for Calmodulin and S100A1*

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Jan Teisinger, Csc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu *Theses.cz* za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 12. 5. 2016

Jan Bílý

Podpis

Poděkování:

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování mému školiteli Ing. Janu Teisingerovi, CSc. za jeho cenné rady a trpělivost při vedení dizertační práce. Děkuji celému vědeckému kolektivu za vytvoření skvělých pracovních podmínek a odborný dohled po celou dobu mého působení v laboratoři proteinových struktur. Velké díky patří zejména Mgr. Lence Gryčové, Ph.D. za pomoc při vyhodnocování dat a mnoho rad týkajících se fluorescenčních měření.

Děkuji mým rodičům a přátelům za podporu a toleranci během celého studia.

ABSTRAKT

Charakterizace vazebných míst pro kalmodulin a S100A1 na intracelulárních koncích TRPC6 receptoru

Skupina TRP (transient receptor potential) iontových kanálů je rozsáhlou třídou membránových receptorů. Součástí této skupiny jsou i kanonické kanály TRPC se sekvencí analogickou TRP kanálům poprvé objevených u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Tyto membránové kanály jsou zapojeny do mnoha fyziologických procesů v různých typech buněk a tkání. TRPC6 je neselektivní kationtový kanál, který řídí intracelulární rovnováhu vápenatých iontů eukaryotických buněk (včetně senzorických a receptorových buněk) jako odpověď na vnější podněty. TRPC6 obsahuje vazebnou doménu CIBR (Calmodulin inositol binding region), který je schopen vázat vápník vázající protein S100A1. Cílem práce je charakterizace vazebného místa CIBR lokalizovaného na C intracelulárním konci TRPC6 pro kalmodulin (CaM) a S100A1. Pomocí bodové mutace byl připravený rozpustný proteinový fragment TRPC6 CT (801-878) se záměrně vyměněnými aminokyselinami. V případě některých vybraných bazických aminokyselin (Arg852, Lys856, Lys859, Arg860 a Arg864) nesoucích pozitivní náboj byl měřením anizotropie fluorescence potvrzen jejich vliv a účast na tvorbě komplexu TRPC6 s CaM i S100A1. Obě interakce jsou závislé na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Homologní model komplexu TRPC6-CaM prokázal sekvenční rozpoznávací motiv 1-5-10 vhodný pro CaM. Avšak výsledky naznačují jedinečnou interakci překrývajícího vazebného místa pro S100A1 na C konci TRPC6, protože trojitá mutace Arg852/Lys859/Arg860 významně narušila vazbu komplexu S100A1-TRPC6.

Klíčová slova: anizotropie fluorescence, Ca^{2+} vazebný protein, iontové kanály, kalmodulin, S100A1, TRPC receptor, TRPC6

Identifikační záznam:

BÍLÝ, Jan. *Charakterizace vazebných míst pro kalmodulin a S100A1 na intracelulárních koncích TRPC6 receptoru. [Identification of the binding sites on transient receptor potential cation channel TRPC6 for Calmodulin and S100A1]* Praha, 2016. 105 s., 7 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, Ústav 2. LF UK. Vedoucí práce Teisinger, Jan.

ABSTRACT

Identification of the binding sites on transient receptor potential cation channel TRPC6 for Calmodulin and S100A1

The TRP (transient receptor potential) group of ion channels represents a large subset of membrane receptors. A part of this supergroup are canonical TRPC channels with a sequence homology analogical to TRP receptor first discovered at fruit fly (*Drosophila melanogaster*). These membrane channels are involved in a variety of physiological functions in different cell types and tissues. TRPC6 is a non-selective cation channel that modulates the calcium level in eukaryotic cells (including sensory receptor cells) in response to external signals. TRPC6 channel contains binding domain CIBR (Calmodulin inositol binding region), which is also able to adapt to calcium binding protein S100A1. Characterisation of the integrative binding site for calmodulin (CaM) and S100A1 at the C-tail of TRPC6 is presented in this work. Using site-directed mutagenesis, soluble protein fragments TRPC6 CT (801-787) were prepared with intentional changes in amino acid sequence. Several positively charged amino acid residues (Arg852, Lys856, Lys859, Arg860 and Arg864) were determined by measurement of fluorescence anisotropy influence and their participation in the calcium-dependent binding of CaM and/or S100A1 to the TRPC6 termini. Both interactions are influenced by presence of Ca^{2+} ions. Homology model of complex TRPC6-CaM revealed a 1-5-10 recognition motif suitable for CaM. However, results indicate a unique involvement of overlapping binding site for S100A1 on the C tail of TRPC6. The triple mutation Arg852/Lys859/Arg860 exhibited significant disruption of the S100A1-TRPC6 complex.

Keywords: anisotropy fluorescence, Ca^{2+} binding proteins, calmodulin, ion channel, S100A1, TRPC receptor, TRPC6

BÍLÝ, Jan. *Charakterizace vazebných míst pro kalmodulin a S100A1 na intracelulárních koncích TRPC6 receptoru. [Identification of the binding sites on transient receptor potential cation channel TRPC6 for Calmodulin and S100A1]*. Praha, 2016. 105 s., 7 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, Ústav 2. LF UK. Vedoucí práce Teisinger, Jan.

SEZNAM ZKRATEK

ARD	(angl. Ankyrin Repeat Domain) doména s opakujícím se ankyrinovým motivem
AMK	aminokyselina
Amp	antibiotikum – ampicilin
Kan	antibiotikum – kanamycin
ATP	adenosintrifosfát
BCA	bicinchoninová kyselina
bp	(angl. base pair) relativní jednotka udávající velikost molekuly DNA v počtu bazí
βME	beta-merkptoetanol
Ca ²⁺	vápníkový kationt
CaM	kalmodulin
CaM-BD	(angl. Calmodulin Binding Domain) vazebná doména pro kalmodulin
CD	cirkulární dichroismus
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
Cav1.1	(angl. L-type voltage-dependent calcium channel) vápníkový receptor v buňkách skeletálního svalstva
Da	(angl. Dalton) chemická jednotka hmotnosti biomolekul
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNSC	dansylchlorid (5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonyl chorid)
dNTP	směs trifosfátových nukleotidů dATP, dTTP, dCTP, dGTP (adenosin-, tyamin-, cytosin-, guanosin-)
DTT	dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	etylenglykol-di-(2-aminoetyleter)tetraoctová kyselina
His	aminokyselina histidin
HisTag	histidinová kotva
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid

LB	(LB médium) živný roztok podle protokolu Luria-Bertaniho
NMR	nukleární magnetická rezonance
O.D.	(z angl. Optical Density) optická hustota
Orai1	lidský homolog <i>olf186-F</i> protein
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr
PCR	(z angl. Polymerase Chain Reaction) polymerázová řetězová reakce
PDZ	PDZ doména – akronym z prvních písmen proteinů sdílejících tuto doménu charakteristickou pro signální proteiny, které organizují proteinové komplexy na membránách (P – post synaptic density protein PSD95, D – Drosophila disk larger tumor suppressor Dlg1, Z – zonula occludens 1 protein Zo-1)
PIP ₂	fosfatidylinositol(4,5)bisfosfát
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PMSF	fenylmetansulfonylfluorid
RPM	(angl. Revolution Per Minute) jednotka pro úhlovou rychlost rotoru centrifugy
RT	(angl. Room Temperature) teplota v místnosti
SERCA	(angl. Smooth Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase) membránová ATPázová pumpa endoplazmatického retikula
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS – PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SOCE	(angl. Store-Operated Ca ²⁺ Entry) název pro skupinu iontových kanálů kontrolujících vstup Ca ²⁺ iontů do cytoplazmy
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometan
TRP	(angl. Transient Receptor Potential) iontové kanály tvořící přechodný membránový potenciál

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
OBSAH.....	9
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
1.1 TRP kanály.....	12
1.1.1 Evoluční vývoj.....	13
1.1.2 Rozdělení TRP kanálů	14
1.1.3 Charakteristika TRP kanálů.....	16
1.1.4 Domény TRP kanálů.....	18
1.2 TRPC rodina.....	19
1.2.1 Struktura TRPC receptoru	19
1.2.2 Funkce a regulace TRPC kanálů.....	26
1.2.3 Charakteristika jednotlivých členů TRPC rodiny.....	30
1.3 TRPC6.....	33
1.3.1 Gen a protein.....	34
1.3.2 Vlastnosti iontového kanálu TRPC6.....	36
1.3.3 Regulace TRPC6.....	37
1.4 Rodina S100 proteinů.....	39
1.4.1 Struktura S100	40
1.4.2 S100A1	42
1.4.3 Proteiny S100 a jejich vazba na iontové kanály	43
1.5 Kalmodulin.....	45
1.5.1 Vazebné principy kalmodulinu a jeho cílových partnerů	47
1.5.2 TRPC rodina a kalmodulin	49
2 CÍLE PRÁCE	51
3 MATERIÁL A METODY	52
3.1 Konstrukce expresních plazmidů	52

3.2	Konstrukce mutantních verzí konstruktů TRPC6	52
3.3	Exprese a purifikace konstruktů TRPC6 (801 – 878)	54
3.4	Exprese a purifikace S100A1 pro vazebné experimenty	55
3.5	Fluorescenční spektroskopie	56
3.5.1	Fluorescenční sonda – Dansylchlorid	57
3.5.2	Značení fúzního proteinu S100A1 dansylchloridem	58
3.5.3	Anizotropie fluorescence	58
3.5.4	Stanovení disociační konstanty	61
3.6	CD spektroskopie	61
3.7	Hmotnostní spektrometrie	62
3.8	EMSA	62
3.9	Homologní modelování struktury komplexu	63
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	64
4.1	VÝSLEDKY	64
4.1.1	Příprava fúzního proteinu TRPC6 CT	64
4.1.2	Cirkulární dichroismus	65
4.1.3	EMSA	67
4.1.4	Gelová permeační chromatografie	68
4.1.5	Fluorescenční vazebné studie	69
4.1.6	Homologní model komplexu C terminálního TRPC6 s kalmodulinem ...	76
4.2	DISKUZE	80
4.2.1	TRPC6 Kalmodulin	80
4.2.2	TRPC6 a S100A1	83
4.2.3	TRPC6 a vápník vázající proteiny - kalmodulin, S100A1	86
5	ZÁVĚR	87
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88
7	PŘÍLOHY	99

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1.: Schematické rozdělení TRP kanálů.....	14
Tab.1.: TRP podrodiny u živočišných druhů.....	15
Obr.2.: Struktura TRPC kanálu.....	20
Obr.3.: Vazebné domény strukturální znaky u TRPC rodiny.....	22
Obr.4.: Proudové charakteristiky jednotlivých členů TRPC	25
Obr.5.: Schematické zobrazení sekvence TRPC6	37
Obr.6.: Strukturální model S100A1 proteinu	40
Obr.7.: Model komplexu S100A1 a ryanodinového receptoru.....	43
Obr.8.: Model kalmodulinu	45
Obr.9.: Kalmodulinové vazebné místo pro cílové proteiny	46
Obr.10.: TRPC rodina a její vazebná místa pro kalmodulin.....	49
Obr.11.: Fluorescenční sonda	56
Obr.12.: Excitační a emisní spektra pro fluorescenční sondu dansylchlorid.....	57
Obr.13.: Uspořádání měření anizotropie fluorescence	59
Obr.14.: Aminokyselinová sekvence TRPC6 CT (801-878).....	63
Tab.2.: Zastoupení sekundární struktur měřených proteinů	64
Graf.1.: Spektrum cirkulárního dichroismu pro S100A1 a TRPC6CT(801-878).....	65
Obr.15.: Nativní PAGE CaM titrovaný TRPC6 CT (801-878)	66
Graf.2.: Gelové permeační chromatografie TRPC6 CT (801-878) a S100A1	68
Tab.3.: Disociační konstanty pro konstrukty TRPC6 CT (801-878) s kalmodulinem ...	69
Graf.3.: Měření anizotropie v rovnovážném stavu vybraných konstruktů TRPC6 CT (801-878) s CaM naznačeným dansylchloridem	71
Graf.4.: Vliv Ca^{2+} iontů na vznik komplexu TRPC6 CT (801-878) WT - S100A1	72
Tab.4.: Disociační konstanty pro konstrukty TRPC6 (801-878) CT s S100A1	73
Graf.5.: Měření anizotropie v rovnovážném stavu vybraných konstruktů TRPC6 CT s naznačeným S100A1	74
Obr.16.: Strukturální počítačový model komplexu CaM s TRPC6 CT (801-878).....	76
Obr.17.: Pohled na komplex TRPC6 CT (801-878) s kalmodulinem	77

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 TRP kanály

Důležitou vlastností živého organismu je schopnost rozlišit velké množství vjemů a podnětů z okolního prostředí a umět rychle reagovat a odpovídat na ně. Na molekulární úrovni tuto funkci plní iontové kanály a receptory umístěné na plazmatické membráně. Celá škála fyzikálních a chemických podnětů včetně mechanických, teplotních, světelných, pachových, feromonových stimulů aktivuje specifické iontové kanály, které se účastní reakce. Tyto membránové kanály umožňují buňce rychle regulovat koncentrace iontů uvnitř a vně buňky, tím dochází ke změnám elektrické aktivity membrány a buňka je schopna přijímané signály z okolních podnětů modulovat nebo přímo na ně odpovídat. Receptorová rodina TRP (z angl. Transient Receptor Potential) je významnou skupinou iontových kanálů, které se podílejí na integraci a transdukcii podnětů. Rodina patří mezi membránové iontové kanály, které jsou aktivovány zmíněnými podněty cestou intracelulárních, extracelulárních a druhých posílů. TRP receptory jsou transmembránovým přechodem pro mono a bivalentní kationty. Různá receptorová citlivost a specifita k těmto kationtům je důvodem množství a variability biologických procesů, do kterých jsou zapojeny. Pochopení mechanismů, které vedou k aktivaci případně k inhibici TRP receptorů, je zásadní krok k objasnění a následnému efektivnímu odstranění řady patofyziologických stavů, které jsou přímým důsledkem špatné funkce těchto TRP kanálů.

TRP receptory jsou součástí buněčných membrán téměř ve všech typech buněk excitovatelných i neexcitovatelných tkání. Výjimku tvoří pouze jaderná a mitochondriální membrána. Většina TRP kanálů se vyskytuje na cytoplazmatické membráně, kde mají nepostradatelnou funkci v transportním transmembránovém aparátu pro ionty vápníku, hořčíku a trojmocných kovů ve stopovém množství. Řídí a kontrolují množství iontů, které pronikne do buňky. Příspěvky TRP receptoru jsou nezbytné pro fyziologické procesy od čistě sensorových funkcí (feromony, chuť, bolest a teplota), přes regulaci homeostázy (Ca^{2+} , Mg^{2+} resorpce a osmoregulace) po spoustu dalších motilních funkcí jako je např. svalová kontrakce a vasomotorická regulace (Na^+ , Ca^{2+}) (Nilius and Owsianik 2011).

1.1.1 Evoluční vývoj

Poprvé byl gen *trp* popsán u (*Drosophila melanogaster*), při studiu odpovědi na světlo. Pokusy na zrakovém systému odhalily mutantní formu octomilky se zrakovým poškozením, která měla při stálém osvětlení pomíjivou reakci místo neměnné odpovědi na elektoretinogramu (Cosens and Manning 1969). Mutantní forma byla nazvána „Transient Receptor Potential“. Trvalo 20 let, než byl gen konkrétně popsán (Montell and Rubin 1989). Proteinový produkt *trp* genu má strukturu transmembránového iontového kanálu průchodného pro vápníkové ionty (Ca^{2+}), který je aktivován světlem (Hardie and Minke 1995). Rozvoj molekulárních metod vedl k objevu dalšího TRP iontového kanálu, tentokrát u savců (Wes, Chevesich et al. 1995), a postupně byla objevena a popsána celá velká rodina iontových kanálů tvořících důležitou součást regulačního aparátu pro kationty u buněk obratlovců a bezobratlých. Výzkum dosud ještě neodhalil transkripční faktory regulující promotory těchto „*trp*“ genů.

Evoluční vývoj genu pro TRP kanály začíná zelenými řasami, u kterých bylo identifikováno několik genů podobných *trp* genům. Kódovaný proteinový kanál plní svou funkci v Ca^{2+} signálních drahách zelených řas (*Osteococcus tauri*). Genetickým výzkumem byla potvrzena domněnka, že suchozemské rostliny, které se evolučně oddělily od řas, postupně ztratily geny pro TRP kanály. Přítomnost *trp* genů byla dosud prokázána u hub a v živočišné říši (Wheeler and Brownlee 2008).

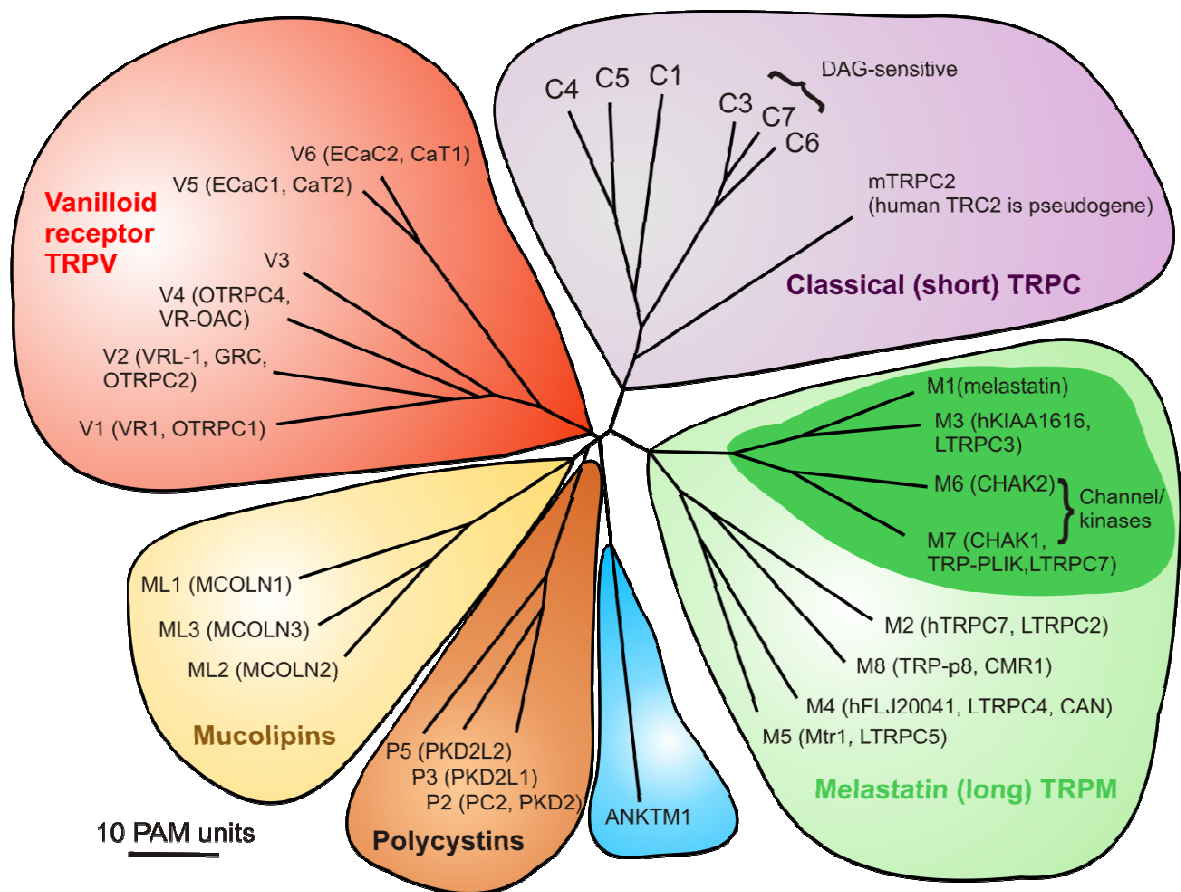
U hub je TRP rodina zastoupena jediným genem TrpY1 (známým jako Yvc1 = Yeast vacuolar conductance 1), který kóduje vakuolární membránový protein, regulující vakuolární osmotický tlak v kvasinkách a plní funkci mechanosenzoru (Zhou, Su et al. 2007). Kvasinkový TRP kanál je aktivován roztažením vakuolární membrány nebo působením aromatických sloučenin podobných indolu. Po nárůstu osmotického tlaku jsou následně uvolněny vápníkové ionty z vakuoly skrz aktivovaný kanál do cytoplazmy (Haynes, Zhou et al. 2008). Přítomnost aromatických reziduí v oblasti šestého transmembránového segmentu způsobuje také otevření kanálu. Ekvivalentní aktivace byla popsána i u TRP kanálů přítomných v tkáních vícebuněčných organismů (Chang, Schlenstedt et al. 2010). Sekvenční homologie TrpY1 odhalila podobnost se známými TRP kanály. Proto je TrpY1 považován za předchůdce TRP mechano a chemosenzorů (Palmer, Zhou et al. 2001).

Evoluční vývoj živočišné říše zřejmě začal trubénkami (*Choanoflagellata*). Ty jsou schopny utvářet kolonie jedinců s různým stupněm specializace. Genetická výbava bičíkatých (*Choanoflagellatae*) taktéž evolučním předstupněm pro objevené TRP kanály u živočichů. U těchto drobných jednobuněčných eukaryotních organismů se totiž vyvinul systém signalizace obsahující transmembránové iontové kanály, využívající vápníkové ionty. Podobně jsou využívány i kanály řídící transport iontů do buněk SOC (Store-Operated Channel), a též membránových receptorů řídících membránové napětí VOC (Voltage-Operated Channel). Vzdálenou příbuznost s TRP receptory potvrzují i společné modulující a řídící molekuly, které interagují s těmito membránovými kanály.

Během vývoje se u obratlovců vyvinula početná rodina TRP receptorů, která byla postupně rozdělena do podrodin (viz. 1.1.2). Postupně se zredukovala skupina receptorů, která měla na starosti vnímání tlakových podnětů (mechano-senzitivní receptory – TRPN podrodina). U TRP kanálů zapojených do homeostázy vápenatých a hořečnatých iontů, došlo k nárůstu variability. Transmembránové TRP kanály se postupně začaly účastnit percepční funkce organismu a začlenily se do vnímání tepelných, chemických změn okolí a signálních drah. Diferenciace mezi nimi nastala jak na strukturní tak i na fyziologické úrovni. Díky této rozdílnosti byly u TRP kanálů charakterizovány jednotlivé podrodiny, například kanonická (TRPC), vaniloidní (TRPV), melastatinová (TRPM) a další. Tomuto rozdělení se věnuje následující kapitola 1.1.2.

1.1.2 Rozdělení TRP kanálů

Nyní je známo v živočišné říši přes odlišných 100 *trp* genů (Tab.1.). Lidské *trp* geny mají délku od 11,4 do 911 kbp (z angl. kilo base pair) s variabilním počtem exonů, který se pohybuje v rozmezí od 11 do 39. *Trp* geny kódují skupinu 30 iontových kanálů tvořících TRP rodinu, která se účastní nejen reakcí na tepelné, mechanické, chemické a tlakové stimuly, ale i na řadu fyzikálních a chemických podnětů (Voets, Talavera et al. 2005). Na základě strukturní podobnosti jsou TRP kanály rozděleny do podrodin (Obr.1.):



Obr.1.: Schematické rozdělení TRP kanálů

U obratlovců byly TRP kanály na základě sekvenční homologie rozděleny do šesti podrodin. Funkčně se ovšem jednotlivé TRP kanály v rámci stejné podrodiny liší. (Clapham 2003)

TRPC podrodina („canonical“ = klasická) zahrnuje nejbližší homology k původnímu TRP kanálu popsanému u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Více věnováno v následující kapitole 1.2

TRPV podrodina je pojmenována podle vaniloidního receptoru 1 (TRPV1) vyskytujícího se v nervových zakončeních, kde pomáhá zpracovávat vnímání tepla a bolesti.

Do podrodiny **TRPM** patří iontové kanály s podobnou homologií k melastatinovému receptoru (TRPM1).

TRPML a **TRPP** rodina zahrnuje proteinové homology k mucolipinu, respektive k polycystinu.

Všechny kanály patřící do podrodiny **TRPA** jsou zodpovědné za nociceptivní vnímání, pro které je charakteristická přítomnost 14 ankyrinových domén.

TRPN podrodinou kanálů je nazvaná skupina podobná iontovému kanálu NOMP-C (NO-mechano-potential C) popsáném u (*Caenorhabditis elegans*). Z tabulky (Tab.1.) je patrné snížení počtu mechanoreceptorů podrodiny u obratlovců. Tím jediným TRPN kanálem byl popsán mechanosenzor u sladkovodní ryby zebřičky (*Danio rerio*).

	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> ^b	<i>Ciona intestinalis</i> ^b	<i>Fugu rubripes</i>	<i>Danio rerio</i> ^b	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
TRPC	3	3	8	8	8	7	6
TRPV	3	5	2	4	4	6	6
TRPM	1	4	2	6	6	8	8
TRPA	4	2	4	1	2	1	1
TRPN	1	1	1	-	1	-	-
TRPML	4	1	9	2	2	3	3
TRPP	1	1	1	4	4	3	3
Total	17	17	27	25	27	28	27

Tab.1.: TRP podrodiny u živočišných druhů

Souhrnná tabulka identifikovaných TRP kanálů u různých živočišných druhů. TRPN podrodina mechanosenzorů se nevyskytuje u *Homo sapiens*, ovšem u obratlovců byla potvrzena u zebřiček (*Danio rerio*) (Nilius and Owsianik 2011).

Počet členů jednotlivých podrodiny je mezidruhově velmi proměnlivý. Transmembránové domény mají konzervovanější sekvenci v rámci jednotlivých podrodin. Srovnání proteinové sekvence členů podrodin v rámci jednoho živočišného druhu odhalilo podobnost sekvence přibližně z 35%. V podrodinách se vyskytují čistě duplicitní páry kanálů (například TRPC6 s TRPC7; TRPM4 s TRPM5; TRPV5 s TRPV6), u kterých je podobná aminokyselinová sekvence v rozmezí 50 až 80%. Tahle variabilita a vnitřní rozdělení podrodin způsobily z velké části genové duplikace.

1.1.3 Charakteristika TRP kanálů

Nejvíce informací o struktuře TRP kanálu je zatím známo z „*in silico*“ experimentů a strukturně funkčních studií podobných proteinových receptorů. Dosud se

nepodařilo získat 3-D strukturní model. Nejmodernější metody pro studium struktury, jako jsou rentgenová strukturní analýza nebo nukleární magnetická rezonance, zatím nemají dostatečná data pro celý TRP receptor. Strukturní informace poskytla sekvenční analýza, protože mezi transmembránovými iontovými kanály je obecně velmi blízká podobnost. Typické složení TRP kanálů se podařilo zjistit díky napětím aktivovaným draslíkovým kanálům, které jako TRP kanály patří do stejné receptorové proteinové super rodiny (Harteneck, Plant et al. 2000). TRP receptor se skládá z transmembránové domény, která kotví proteinový kanál v membráně a obsahuje segmenty pro tvorbu membránového póru. Terminální konce C a N jsou orientovány směrem do cytosolu. V nativní formě se spojuje do funkčních homo, nebo heterotetramerních podjednotek. TRP kanály dokonce mohou tvořit mezi sebou složité heteromultimerní typy kanálů, protože mezi některými z nich je vysoká sekvenční homologie, která záměnu umožňuje. Tato vlastnost způsobuje pestrou funkční různorodost kanálů. K možným záměnám dochází většinou v rámci jedné podrodiny a nebo různých podrodin, jako je tomu například u TRPC podrodiny. Fakt byl potvrzen biofyzikálními analýzami u některých složených zkoumaných TRP kanálů (Kedei, Szabo et al. 2001).

Transmembránová doména TRP kanálů obsahuje 6 helixových segmentů (S1-S6) zapuštěných v membráně a bývá dělena do dvou stavebních bloků. Oblast zahrnující první 4 transmembránové segmenty S1 – S4 se nazývá „senzor“, který reaguje na receptorové molekuly, analogicky jako senzor u K^+ receptorů, reaguje na signál elektrického napětí a je zodpovědný za aktivaci a otevření receptoru. Zmapována byla vazebná místa pro kapsaicin u TRPV1 (Jordt and Julius 2002) respektive pro icilin u TRPM8, která byla lokalizována, mezi S2-S3 segmentem, přímo v oblasti senzoru. (Chuang, Neuhausser et al. 2004). Druhý blok domény je tvořen ze zbývajících segmentů S5 – S6, které umožňují transmembránový průchod lipidovou dvojvrstvou pro ionty a další hydrofilní molekuly, pro které je tato lipidová membrána jinak neprostupná. Takový to membránový pór je selektivní. Důležitou součástí je selektivní filtr v podobě zúžení okolí v centrální části póru. Stereochemické a elektrostatické vlastnosti určují, která molekula, nebo který iont, smí proniknout na druhou stranu membrány. Kryoelektronová mikroskopie provedená na TRPC3 kanálu odhalila, velkou membránovou doménu kubického tvaru obklopenou vnější schránkou propletených řetězců, které slouží pro aktivátory a modulátory. Globulární doména tvoří vnitřní

komůrku, která může ovlivňovat iontový průtok (Mio, Ogura et al. 2007). Oba terminální konce jsou zanořeny do cytosolu buňky. U TRP kanálů se na cytosolických N a C koncích nachází regulační domény, které mohou měnit vlastnosti otvírání a zavírání kanálu. Díky různorodosti cytosolických domén je strukturní hledisko u TRP kanálů cennou informací pro jejich modulaci a řízení.

1.1.4 Domény TRP kanálů

TRP kanály jsou rozděleny na základě sekvenční homologie do sedmi podrodin, avšak uvnitř rodiny je patrná funkční variabilita způsobena přítomností regulačních domén na intracelulárních amino- a karboxyl- koncích, které se liší od sebe jak délkou, tak počtem vyskytujících se domén. Na cytosolickém konci byly identifikovány některé běžné protein-protein interakční motivy, jako je např. opakování ankyrinového motivu, kalmodulin vázající místo nebo PDZ doména. Další motivy jsou postupně zjišťovány převážně metodou sekvenční analýzy.

Zajímavostí je, že v několika případech má C terminální konec dokonce enzymovou aktivitu. Například TRPM2 má doménu s Nudix hydrolázovou aktivitou, která funguje jako ADP-ribózapyrofosfatáza (Perraud, Fleig et al. 2001). Iontové kanály TRPM6 a TRPM7 disponují na C konci doménou s kinázovou aktivitou (Runnels, Yue et al. 2001).

Dalším znakem pro TRP receptory je přítomnost a opakování ankyrinového motivu na N terminálním konci většiny z nich. Ankyrinový motiv se skládá z 33 AMK řazených do antiparalelních párů α -helixů spojených β -vlásečkou. Počet opakování ankyrinových domén (ARD – Ankyrine Repeat Domain) je různý: 3-4x u TRPC, 6x u TRPV, 14-15x u TRPA a až 29x u TRPN. Hlavní funkcí ARD je tetramerizace iontového kanálu. Důležitou funkci plní při interakci s ligandy případně s dalšími proteinovými partnery (Gaudet 2009). Dosud se podařilo vykristalizovat ankyrinovou doménu u TRPV2 kanálu a to jako jedinou z celé rodiny TRP kanálů (Jin, Touhey et al. 2006; Gaudet 2009).

Mezi další domény a vazebné motivy, které jsou přítomny na intracelulárních koncích, které mají vliv na funkci iontového kanálu, jsou např. kalmodulin vazebná

doména (CaM-BD), „*EF-hand*“ motivy, oblasti zodpovědné za lipidové interakce, neuspořádaný úsek „coiled-coil“ nebo fosforylační místa. Výskyt domén je velice různý a často se liší i mezi členy stejné skupiny.

1.2 TRPC rodina

TRPC rodina patří mezi první objevenou skupinu TRP kanálů. Při studiu světelné percepce u octomilky (*Drosophila melanogaster*) a následném hledání zodpovědného genu, byly popsány podobné kanály vykazující velkou sekvenční homologii mezi sebou (Hardie 2001). Tato skupina TRP kanálů byla pojmenována jako klasické („canonical“), zkráceně TRPC.

Rodina TRPC sjednocuje nejbližší homology s TRP kanály popsaných právě u octomilky (*Drosophila melanogaster*). TRPC byly první definovanou rodinou, avšak i přes intenzivní výzkum nejsou dosud dobře charakterizovány. Fyziologické funkce u většiny členů nejsou zcela jasné včetně mechanismů, které je aktivují (Putney 2004).

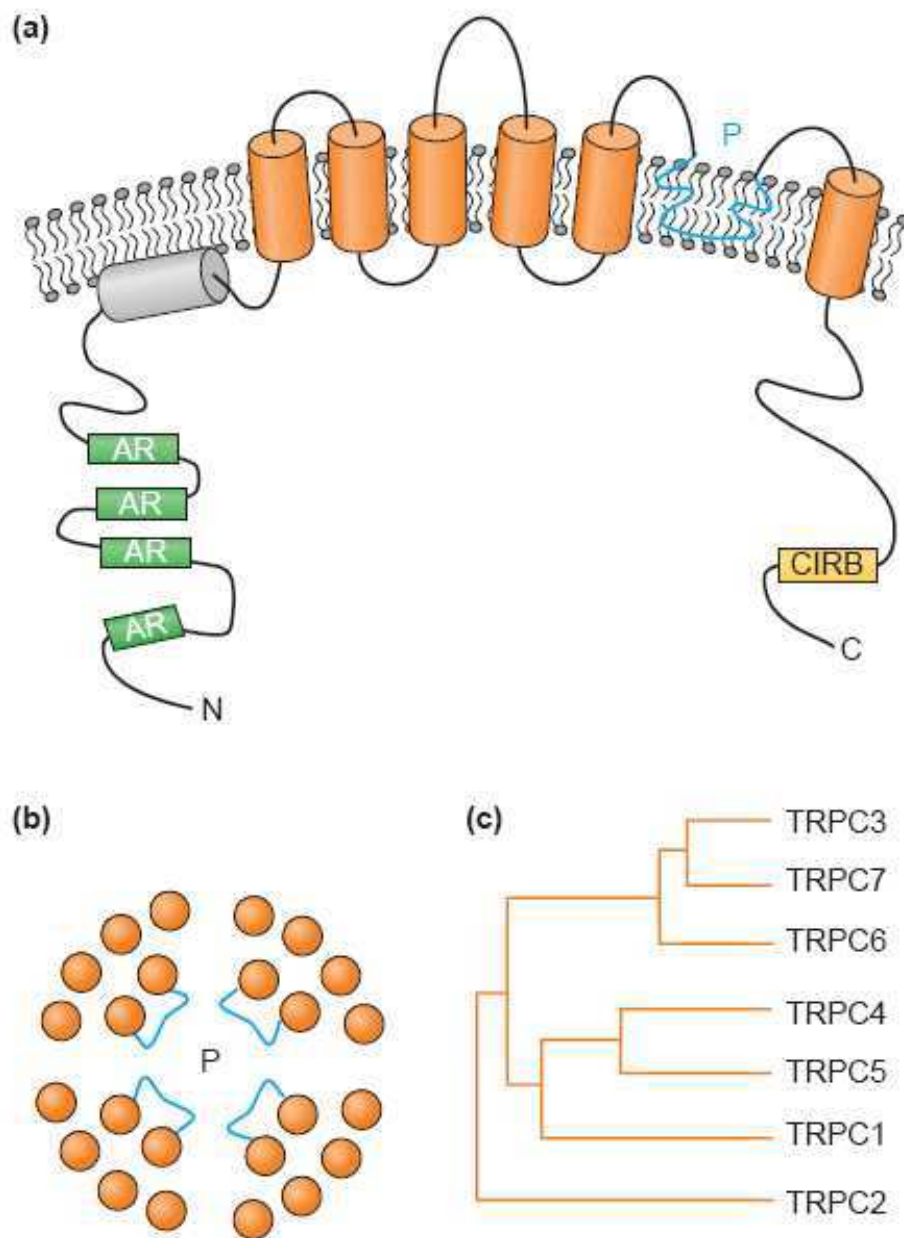
Rodinu TRPC tvořenou sedmi členy, můžeme na základě funkční a sekvenční homologie rozdělit do 4 skupin TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7, TRPC4/5. Někdy se uvádí rozdělení pouze do tří skupin, kdy TRPC1 bývá řazen k TRPC4 s TRPC5 (Obr. 2C). V lidském genomu bylo identifikováno pouze šest funkčních TRPC kanálů. TRPC2 má u lidí a primátů formu pseudogenu a nedochází k jeho transkripci (Liman and Innan 2003). Ovšem u dalších obratlovců je plně rozvinut. TRPC3/6/7 tvoří úzce příbuznou skupinu mající vysokou podobnost aminokyselinové sekvence (70–80 %). Analogicky se u této podskupiny vyskytuje i podobnost ve funkci a farmakologických vlastností. Blízká strukturní a očividně funkční úloha existuje též u TRPC4 a TRPC5 (Pedersen, Owsianik et al. 2005).

1.2.1 Struktura TRPC receptoru

Struktura TRPC kanálu se neliší od obecné struktury TRP kanálu (Obr. 2A). Analýzou zabývající se hydrofobními úseky v aminokyselinové sekvenci bylo u většiny podrodin (včetně TRPC) predikováno 7 segmentů, z nichž první (S0) zřejmě nemá jasně

danou pozici a roli při tvorbě membránového póru, následujících 6 segmentů umístěných v membráně spolupracuje na tvorbě transmembránového kanálu. Predikovaný membránový pór je lokalizován mezi 5. a 6. transmembránovým segmentem, kde je přítomná i krátká hydrofobní smyčka. Oba dva terminální konce jsou orientovány intracelulárně a obsahují modulující domény (Vannier, Zhu et al. 1998).

N-terminální konec se skládá z 3-4 ankyrinových opakujících se domén, neuspořádané oblasti CC „coiled-coil“ a regionu schopného interakce s caveolinem (Brazer, Singh et al. 2003). Cytoplazmatický C - terminální konec obsahuje charakteristický vzor pro TRP kanály – sekvenční motiv EWKFAR, za kterým následuje evolučně konzervovaná oblast bohatá na prolin. Dále byla na C konci dokázána přítomnost CIBR regionu vázající kalmodulin, případně inositoltrifosfát (IP₃) (CIBR – Calmodulin Inositol Binding Region) (Obr.2A.). Prodloužený C terminální konec TRPC4 a TRPC5 obsahuje unikátní doménu s typickým PDZ motivem, který pomáhá udržovat a organizovat signální komplexy na buněčných membránách (Vazquez, Wedel et al. 2004).



Obr.2.: Struktura TRPC kanálu

A) Schematické zobrazení TRPC proteinu včetně predikovaných membránových úseků a zjištěných domén (hydrofobní segmenty S0 (šedá barva), S1-S6 (oranžová barva); AR – ankyrinová opakující se doména; modře je naznačena hydrofobní smyčka tvořící transmembránový pór (P) mezi 5. a 6. hydrofobním segmentem aminokyselinové sekvence; CIBR – region vázající kalmodulin a inositoltrifosfát)

B) Seskupení TRPC receptoru v nativní formě do tetramerní struktury.

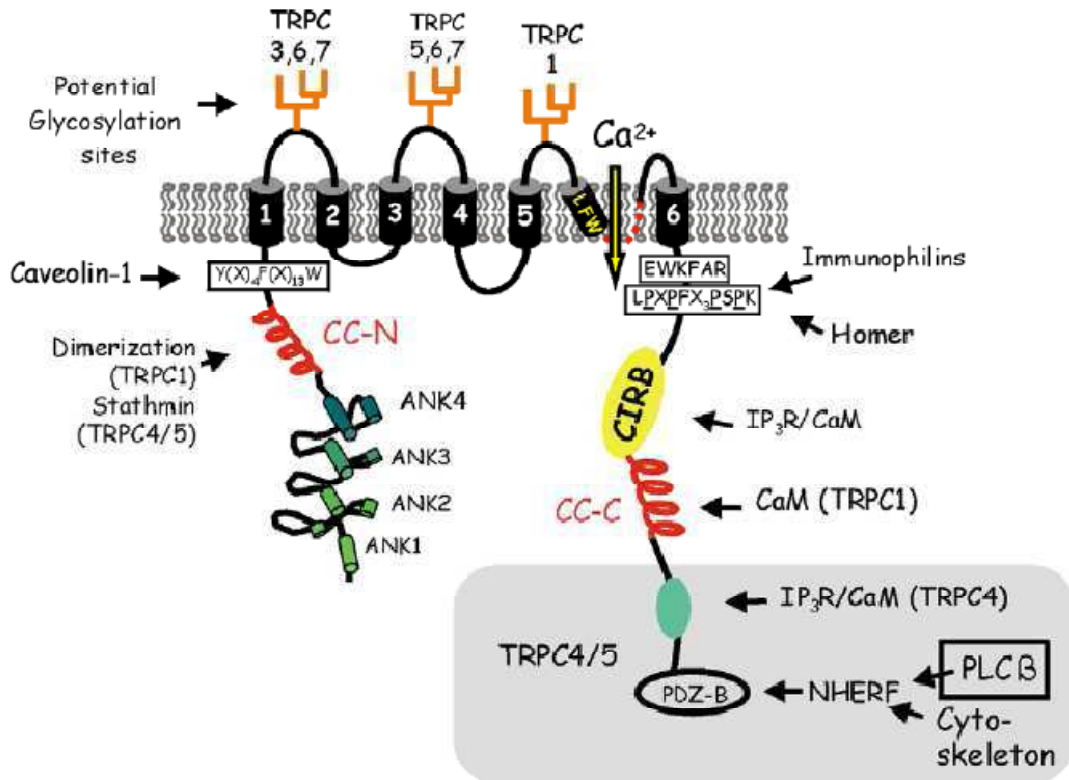
C) Rozdělení TRPC rodiny do podskupin na základě sekvenční homologie a funkční příbuznosti (Putney 2004).

Ankyrinová doména vytváří také prostředí pro protein-proteinovou interakci a vychází vstříc široké škále vazebných partnerů. Ačkoli nerozeznává specifickou sekvenci nebo strukturu, odhaluje na povrchu různé druhy reziduí, a tím se predikce potenciálních cílových proteinů stává složitější. U TRPC rodiny je funkce ankyrinových domén odlišnější. Experimenty se zkráceným N koncem obsahujícím tuto doménu potvrdily její nepostradatelný vliv na správnou dopravu TRPC receptoru na plasmatickou membránu. Delece ankyrinové domény způsobila kumulaci TRPC3 kanálu v intracelulárních kompartmentech. Podobný důsledek absence první ankyrinové domény byl pozorován u TRPC6 (Wedel, Vazquez et al. 2003). Výjimkou je TRPC1, jehož zkrácená varianta bez tří z celkových čtyř ankyrinových domén utváří správně fungující kanály na membráně a reagující na vyčerpání Ca^{2+} zásob (Zitt, Zobel et al. 1996).

Neuspořádaná oblast „coiled-coil“ (CC) má běžně na starosti oligomerizaci proteinového komplexu a možnost kooperace s dalšími proteiny prostřednictvím vazby v CC oblasti. Pro sekvenci je typický vzor opakování sedmi reziduí skládajících α -helix. Tyto helixy mezi sebou interagují a formují oligomerní proteinové struktury. CC oblast se u TRPC kanálů nachází na obou koncích. Přítomnost na N-konci přispívá svou funkcí k homo a heteromerizaci TRPC kanálu při tvorbě tetramerního iontového uskupení, na rozdíl od CC oblasti umístěné na C konci, která není schopna dimerizovat (Engelke, Friedrich et al. 2002). U TRPC5, TRPC4, odpovídá na N konci neuspořádaný region za specifickou vazbu s stathiminem, u kterého byla CC oblast s α -helikální strukturou taktéž potvrzena. (Greka, Navarro et al. 2003). Umístění CC domény na C konci u TRPC3 nemá vliv na funkci a aktivaci kanálu na membráně. Nicméně u TRPC1 se CC doména účastní na vazbě s kalmodulinem a její delece výrazně snižuje aktivitu kanálu TRPC1 v signalizační kaskádě mechanismu vstupu Ca^{2+} do buňky (SOCE – Store Operated Calcium Entry) (Singh, Liu et al. 2002).

U všech členů byl popsán na cytosolickém N konci podobný motiv sousedící s první transmembránovou doménou odpovědný za interakci s caveolinem. Caveolin interaguje s regionem bohatým na aromatické aminokyseliny. Tyto integrální membránové proteiny pomáhají zakotvit TRPC kanály v membráně. Zrušením tohoto

úseku u TRPC1 a TRPC3 bylo zabráněno vzniku kanálu na membráně a negativně ovlivněna řídicí funkce vstupu Ca^{2+} kaskádou SOCE kanálů (Brazer, Singh et al. 2003).



Obr.3.: Vazebné domény strukturální znaky u TRPC rodiny

Obrázek obsahuje zjištěné struktury a vazebné domény u TRPC receptoru. Černě jsou naznačeny transmembránové segmenty S1-S6. Membránový pór se nachází mezi 5. a 6. Segmentem (naznačeno šipkou skrz membránu). Na terminálním N konci jsou lokalizovány proteinové domény: ANK1-4 – ankyrinová doména, CC – „coiled-coil“ neuspořádaný region, který se nachází na obou terminálních koncích. Na C-terminálním konci jsou šedě zvýrazněny specifické domény pro TRPC4 a TRPC5. (PDZ –B - PDZ doména, CIBR – kalmodulin/ IP_3 vázající region, PLC – fosfolipáza C, IP_3R – receptor IP_3 , CaM – kalmodulin) Na obrázku jsou zobrazeny i zachované konzervované aminokyselinové úseky: Y(X)₄F(X)₁₄W; EWKFAR – Trp box sekvence; LFW – sekvenci motiv zachovaný v domnělé oblasti transmembránového póru u všech TRPC kanálů (Vazquez, Wedel et al. 2004).

Systematická analýza celého transmembránového póru u TRPC dosud nebyla provedena. Avšak byly popsány mutace v oblasti hydrofobní smyčky mezi transmembránovými segmenty S5–S6, právě v blízkosti póru, které měly esenciální vliv na senzitivitu kanálu k iontům v souladu s předpokládaným iontovým filtrem v této oblasti. Studie zabývající se funkcí tohoto filtru zjistily důležitost silně konzervovaného aminokyselinového úseku LFW. Při porušení došlo u TRPC5 a TRPC6 receptoru ke změně senzitivity k lanthanoidovým iontům a mírnému omezení funkce receptoru v mechanismu vstupu vápníkových iontů buňky, který je za normálních podmínek lanthanoidovými ionty inhibován. Postupně byla identifikována u TRPC5 nabitá glutaminová rezidua (Glu543, Glu595, Glu598) regulující tuto senzitivitu k lanthanoidovým iontům (Jung, Muhle et al. 2003). Podobně byly nalezeny u TRPC1 v této oblasti aminokyseliny (Glu576, Asp581) hrající důležitou roli v citlivosti na Ca^{2+} ionty (Liu, Singh et al. 2003).

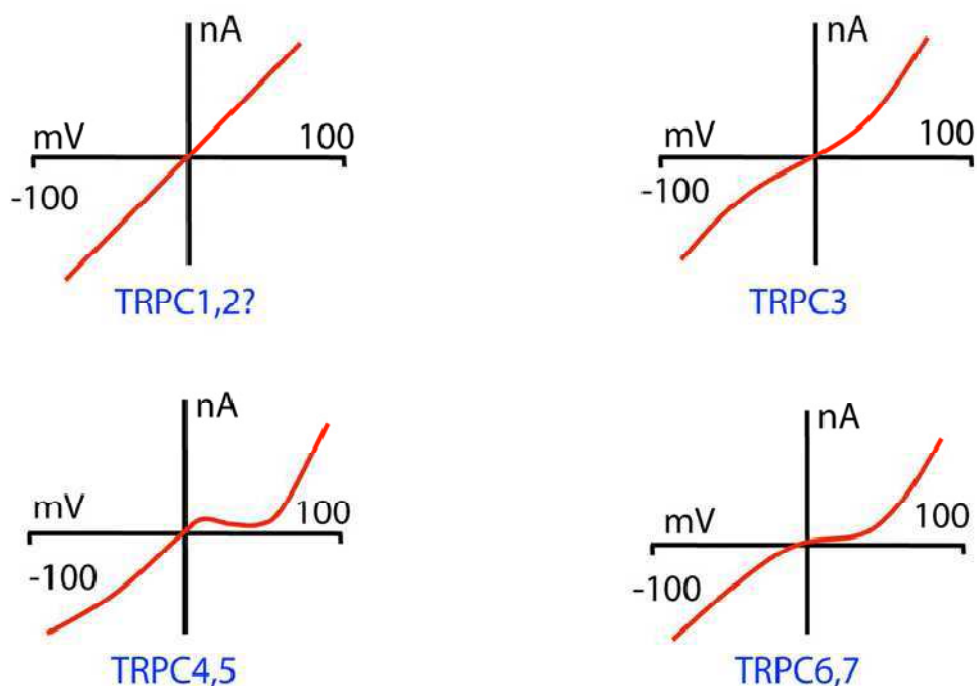
Poslední transmembránový segment je následován konzervovanou aminokyselinovou sekvencí EWKFAR, která je typická pro všechny členy TRPC rodiny. Začátek C terminálního konce obsahuje oblasti a domény, které se podílí na aktivaci a funkci receptoru. Jedním z nich je prolinový úsek interagující s neuronovým proteinem Homer, který iontové kanály asociuje s inositoltrisfosfátovými receptory (IP_3R) mající na starosti uvolňování intracelulárních zásob Ca^{2+} iontů. Do tohoto úseku sekvence se mohou specificky vázat i peptidové imunopresiva konkrétně peptidyl-prolyl cis-trans isomerázy FKBP12 a FKBP52. Imunoprecipitační studie zjistily, že kanály TRPC3/6/7 preferují FKBP12, na rozdíl od FKBP52, který je upřednostňován kanály TRPC1/4/5. Poškozením prolinového úseku zaniká i možnost vazby a regulační funkce imunopresiv inhibovat indukovaný elektrický proud skrz membránový kanál, jak bylo zjištěno například u TRPC6 (Sinkins, Goel et al. 2004).

U všech členů TRPC podrodiny byly popsány interakce s kalmodulem a IP_3R receptory (Tang, Lin et al. 2001). Odpovědnost za tuto skutečnost má tzv. oblast CIBR, která obsahuje vazebný motiv pro oba dva proteiny. TRPC3 kanál má tuto oblast lokalizovanou na C-konci kanálu mezi 751–821 aminokyselinou. IP_3R a TRPC3 jsou součástí mechanismu kontrolujícího vstup vápníkových iontů (SOCE) u buněčné linie HEK293. Do tohoto regionu se váže i kalmodulem. Vazebné motivy se překrývají, což je příčinou, že si vazební partneři CaM a IP_3R konkurují (Boulay, Brown et al. 1999).

TRPC4 a TRPC5 sdílí na prodlouženém C terminálním konci PDZ vazebnou doménu s motivem „VTTRL“. PDZ doména je typická pro „*scaffold*“ proteiny, Na⁺/H⁺ iontové pumpy a regulační faktory. Imunoprecipitací byla prokázána interakce PDZ domény společně s adaptorovým proteinem NHERF, eventuálně s β podjednotkou fosfolipázy C a taky cytoskeletonovými kompartmenty (Tang, Tang et al. 2000). Zkrácená forma TRPC4β bez PDZ domény, snižuje expresi TRPC4 a jeho následnou distribuci na membránu.

Nglykosylace moduluje aktivitu TRP kanálů, které jsou glykosylovány na extracelulárních oblastech. V rámci TRPC podskupiny glykosylace vysvětlila odlišnosti mezi členy TRPC3, TRPC6 a TRPC7. Kanál TRPC3 je monoglykosylován na prvním extracelulárním úseku mezi segmenty S1-S2, zatímco TRPC6 a TRPC7 je diglykosylován v prvních dvou extracelulárních úsecích a jejich bazální aktivita je silně regulována (Dietrich, Mederos y Schnitzler et al. 2003).

TRPC jsou neselektivní membránové iontové kanály propustné pro kationty. Různá selektivita členů pro Ca²⁺/Na⁺ je charakteristická pro tuto podrodinu. Komplikací pro další popis a charakterizaci TRPC je schopnost vytvářet funkční multimerní heterotetramery mezi jednotlivými členy podrodiny, ale i mezi kanály z jiných podrodin. Mezi nejčastěji zastoupené patří komplexy TRPC1 s TRPC4 a TRPC5 (Montell 2005).



Obr.4.: Proudové charakteristiky jednotlivých členů TRPC

Měření elektrofyziologických vlastností členů TRPC odhalilo různé průběhy voltampérových charakteristik, usnadňující popisování heteromerních komplexů TRP kanálů (Wu, Sweet et al. 2010).

Objeveny byly i heteromerní formy mezi TRPC3/TRPC6/TRPC7. Tyhle multimerní kanály mají signifikantně odlišné vlastnosti v permeabilitě a proudových charakteristikách (Obr.4.) od svých homomerních verzí. Elektrochemicky zjištěné voltampérové charakteristiky se používají k determinaci správného složení heteromerních kanálů (Strubing, Krapivinsky et al. 2001; Goel, Sinkins et al. 2002; Hofmann, Schaefer et al. 2002).

1.2.2 Funkce a regulace TRPC kanálů

TRPC jsou především neselektivní membránové iontové kanály propustné pro kationty. Typická pro členy TRPC rodiny je selektivita pro $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$. Charakteristické jsou i další vlastnosti jako vysoká vápníková selektivita, nízká vodivost a variabilita modulace závislé na koncentraci intracelulárního vápníku. Rozdílná deaktivace iontového kanálu ovlivňující intenzitu přenášeného signálu z TRPC dělá ideální

regulační partnery (Bolotina 2008; Birnbaumer 2009; Kiselyov and Patterson 2009).

Dosud z velkého množství studií lze ukázat, že v jistých podmínkách se TRPC kanály chovají dokonce jako kanály zapojené do kontroly vstupu vápníkových iontů do cytoplazmy (SOCE). Účast všech členů TRPC receptorů do SOCE kaskády je ovšem stále diskutabilní, protože byly popsány interakce pouze některých členů TRPC podrodiny s proteiny STIM1 a ORAI1, které jsou kompartmenty SOCE vápníkové regulace. TRPC1 patří mezi ty, které ochotně tvoří komplexy, a tak přispívá k funkci SOCs kanálů (Ambudkar, Ong et al. 2007). Protein ORAI1 taktéž reaguje s TRPC1 a vzniklý komplex moduluje podjednotku proteinu STIM1 (Lu, Branstrom et al. 2010). Imunoprecipitačními studiemi byla prokázána vazba STIM1 s TRPC1, TRPC4 a TRPC5, které jsou zatím řazeny do skupiny regulátorů SOCE (Firth, Remillard et al. 2007; Sours-Brothers, Ding et al. 2009). Interakce ostatních členů byly pozorovány jen v některých expresních systémech a u vybraných linií buněk. Podporují tak názor, že přímé zapojení TRPC kanálu do kaskády SOCE má na svědomí spíše unikátní lipidové složení membrány v okolí kanálů, které tvoří tzv. lipidové rafty (Pani, Ong et al. 2008). Ostatně ani přímé vysvětlení funkce TRPC1 jako SOCE kanálu zatím není známo (Worley, Zeng et al. 2007; Kim, Zeng et al. 2009).

1.2.2.1 Regulace TRPC kanálů

TRPC kanály mohou být aktivovány širokou škálou intracelulárních a extracelulárních podnětů pocházejících z okolí buněk. Citlivost vůči různým podnětům a způsob reakce je určena specifickými podmínkami v buňce, které ovlivňují aktivitu TRPC kanálů, např. fosforylace, lipidové okolí, koncentrace ligandů, přítomnost adaptorových proteinů nebo kombinací více podmínek (Ramsey, Delling et al. 2006).

Jedním způsobem aktivace TRPC kanálů je spolupráce s receptory vázající G proteiny. Případně mohou TRPC být aktivovány kooperací s různými izoformami fosfolipázy C, receptory serin/tyrosin proteinkináz, nebo interakcí s efektorovými molekulami (Venkatachalam, van Rossum et al. 2002).

Přítomnost lipidu 1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerolu (OAG) v membráně ukázala na stálou modulaci aktivace u skupiny kanálů TRPC3/6/7. Tyto kanály mohou být aktivovány diacylglycerolovými lipázami a kinázovými inhibitory na rozdíl od

monoacylglycerolů, které je neaktivují. Samostatný diacylglycerol (DAG), případně OAG je schopni aktivovat TRPC3 a TRPC6.

Mechanismus aktivace kanálů je zajištěn receptory, které spolupracují s fosfolipázou C nezávisle na řízení IP₃R nebo SOCE. Do aktivace se nezapojuje proteinkináza C (PKC) a otevření kanálu signální drahou zahrnující PLC je nezávislé na přítomnosti IP₃ (Trebak, St et al. 2003). Funkce TRPC6 se ukazuje jako regulační receptor.

1.2.2.2 Regulace fosfolipázou

V aktivační dráze pomocí G proteinu je efektorovou molekulou podjednotka G_{αq/11} vázající se na β jednotku fosfolipázy C (PLCβ), která katalyzuje štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) přítomného v membráně, a tím uvolňuje molekuly sloužící jako sekundární mediátory signálu: inositol-1-4-5-trisfosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). IP₃ působí na IP₃ receptory lokalizované v membráně endoplazmatického retikula, a spouští uvolňování Ca²⁺ z jeho zásob. Zatímco DAG se dál šíří podél plasmatické membrány, kde může modulovat ostatní receptorové součásti, nejčastěji jsou to různé formy *Ser/Thr* proteinkináz C (PKC). Další izoformy PKC se mohou aktivovat zvýšenou intracelulární koncentrací Ca²⁺. Rozdílné reakce na původní signál se opět sbíhají v jednu, kterou vyvolal původní efektor.

1.2.2.3 Regulace fosforylací

Fosforylace pomocí proteinových kináz je opakovatelná a reverzibilní posttranslační modifikace, která může ovlivňovat vlastnosti iontových kanálů. Vliv fosforylace byl nejlépe popsán u TRPV1 kanálu (Chuang, Prescott et al. 2001; Crandall, Kwash et al. 2002; Hu, Bhave et al. 2002; Numazaki, Tominaga et al. 2002).

TRPC3 může být fosforylován pomocí cGMP dependentní protein kinázou G (PKG). Mutace dvou fosforylačních míst (Tyr11, Ser263) značně redukuje inhibiční efekt cGMP na influx Ca²⁺ v SOCE dráze vyvolaný TRPC3 (Kwan, Huang et al. 2004). Negativní vliv na regulaci TRPC3 má fosforylace serinu 712 závislá na PKC, tento serin je konzervován napříč celou rodinou TRPC. Fosfolipáza C vytváří mediátorové molekuly jako je diacylglycerol, který způsobuje aktivaci TRPC3 a zároveň generuje

signál pro zpětnou odpověď právě cestou řízené fosforylace PKC (Trebak, Hempel et al. 2005). U TRPC6 regulace aktivity přímou fosforylací zajišťuje interakce s Src proteiny – proteiny tyrosinových kináz (PTK) (Hisatsune, Kuroda et al. 2004). PKC může fosforylovat dokonce i TRPC5. Inhibitory PKC zabránily následné desenzitizaci TRPC5 po aktivování pomocí G-protein vázajícího receptoru. Substituce Tyr 972 na C konci TRPC5 za alanin dramaticky zpomalila tento desenzitizační proces (Zhu, Chae et al. 2005).

1.2.2.4 Regulace proteiny vázající Ca²⁺ ionty

Zvýšením intracelulární Ca²⁺ koncentrace se vápníkové ionty vážou na vápník vazebné proteiny, které jsou alosterickými modulátory receptorů, které pro svou správnou funkci potřebují tyto vazebné proteiny. V případě kalmodulinu (CaM) jsou to Ca²⁺/CaM dependentní kinázy (CaMKs) nebo právě iontové kanály, mezi které patří i TRPC, protože obsahují vazebné domény pro tyto partnery.

Kalmodulin kontroluje mnoho buněčných mechanismů závislých na Ca²⁺ a patří mezi důležité modulátory různých iontových kanálů. Několik studií se zaměřilo na CaM vazebné domény a jejich funkce na regulaci TRP receptorové aktivity (Zhu 2005). První zmínka o interakci mezi CaM a TRP kanály pochází ze studie zabývající se purifikací CaM vazebných proteinů u (*Drosophila melanogaster*) (Phillips, Bull et al. 1992). Výsledkem bylo potvrzení příslušnosti TRPL kanálu (TRP like kanál) do TRP rodiny a lokalizace dvou vazebných motivů pro CaM (CaMBD) na C konci u TRPL kanálu - CaMBD1 (AMK 710–725) a CaMBD2 (AMK 859–871) (Phillips, Bull et al. 1992). CaMBD váže CaM závislým na přítomnosti Ca²⁺ a interakce je regulována fosforylací dvou serinových reziduí S721 S722 (Warr and Kelly 1996; Trost, Marquart et al. 1999).

Vazebné experimenty na TRPC3 kanálu zjistily, že IP₃R a CaM interagují přímo s oblastí na C konci zvanou CaM/IP₃R vazebný region (CIBR) (Boulay, Brown et al. 1999; Zhang, Tang et al. 2001). Interakce CaM s TRPC3 měla inhibiční efekt na funkci kanálu. Zrušení inhibice kanálu se podařilo přítomností IP₃R, který zřejmě konkuruje při vazbě do CIBR oblasti a nahrazuje CaM, tím zpětně aktivuje kanál (Zhang, Tang et al. 2001). Delecí CIBR oblasti byl přerušen správný transport proteinu na membránu,

což naznačuje sekundární funkci této CIBR domény (Wedel, Vazquez et al. 2003). Sekvenční homologií byl CIBR motiv identifikován u všech TRPC kanálů. Nicméně jejich senzitivita a odpověď na CaM a IP₃R je u podrodiny různá (Tang, Lin et al. 2001). Byla prokázána přítomnost více domén citlivých pro CaM interakci. U TRPC4 na C konci byla objevena dvě místa na C konci (AMK 688–759; AMK 786–848), která interagují s kalmodulem způsobem závislým na Ca²⁺ (Trost, Bergs et al. 2001).

C terminální konec TRPC1 je též schopen interakce s CaM, konkrétně s dvěma regiony lokalizovanými mezi AMK 719–749 (CaMBD1) a 756–793 (CaMBD2) (Singh, Liu et al. 2002). Delece první oblasti neměla vliv na thapsigarginem vyvolanou zvýšenou intracelulární koncentraci Ca²⁺, ani na odpověď SOCE kaskády závislé na Ca²⁺ iontech. Nýbrž delece druhé oblasti zvýšila SOCE odpověď a snížila Ca²⁺ dependentní inhibici kanálu (Singh, Liu et al. 2002). Zajímavostí je zapojení adaptorového proteinu Homer a komplexu TRPC1-IP₃R, které je vyžadováno při vzniku odpovědi TRP kanálu na signál. Rozpad dynamického komplexu TRPC1-Homer-IP₃R je souběžný s aktivací TRPC1 (Yuan, Kiselyov et al. 2003).

Regulace aktivity kanálu dependentní CaM byla stanovena u TRPV kanálů, u kterých byla podrobně zkoumána. TRPV1 obsahuje 2 CaM vazebná místa, každé na jednom terminálním konci. Narušení CaMBD domény na C konci způsobuje desenzitizaci TRPV1 kanálu (Numazaki, Tominaga et al. 2003), kdežto vazba CaM do CaMBD domény lokalizované na N konci snižuje capsaicinem vybuzený proud (Rosenbaum, Gordon-Shaag et al. 2004).

1.2.3 Charakteristika jednotlivých členů TRPC rodiny

1.2.3.1 TRPC1

Prvním popsaným členem této rodiny byl TRPC1, který je aktivován cestou G-proteinovou kaskády prostřednictvím metabotropního glutamátového receptoru mGluR1 v neuronech a přispívá k signálu z pomalu excitovatelných postsynaptických buněk (EPSP) (Kim, Kim et al. 2003). TRPC1 poskytuje Ca²⁺ iontům důležitou vstupní dráhu do buněk, a proto je exprimován na různých typech buněk, jako jsou například

endoteliální buňky (Tiruppathi, Ahmmed et al. 2006), krevní destičky (Authi 2007), buňky hladkého svalstva (Dietrich, Chubanov et al. 2006) nebo B lymfocyty (Mori, Wakamori et al. 2002). Diskutabilním tématem je funkce TRPC1 jako mechanosenzitivního kationtového kanálu, odpovědného za membránovou kontraktilitu (Maroto, Raso et al. 2005; Gottlieb, Folgering et al. 2008). Pokus s vypnutým genem pro TRPC1 ukázal snížení sekreci tekutin slinovými žlázami, které jsou řízené neurotransmitery (Liu, Cheng et al. 2007). Princip TRPC1 je podobný s principem TRPC5 při axonovém růstu a větvení neuronů (Yu, Gu et al. 2010). Dříve byl prokázán vliv na vývoj cév. TRPC1 je také zapojen do regulace stavu bdělosti, spánku, ostražitosti a vnímání chuti, díky peptidovému hormonu orexinu A (Larsson, Peltonen et al. 2005).

1.2.3.2 TRPC2

TRPC2 se vyskytuje u lidí ve formě pseudogenu, který zřejmě u nich ztratil svou funkci, ovšem u nižších obratlovců (hlodavci a hadi) má jednu z nejdůležitějších funkcí. Vyskytuje se v senzorických vomeronasálních neuronech Jacobsonova orgánu, kde moduluje čichové signály (Yildirim and Birnbaumer 2007) a převádí feromonové stimuly na nervové signální dráhy (Liman, Corey et al. 1999). Popsána byla i zapojení TRPC2 ve Ca^{2+} signalizační kaskádě při vazbě spermie na vajíčko pomocí zonálního receptoru ZP3 (Yildirim and Birnbaumer 2007). TRPC2 je také zapojen do vyprazdňování intracelulárních zásob Ca^{2+} iontů (Gailly and Colson-Van Schoor 2001). U erytroblastu byla zjištěna aktivace TRPC2 cestou IP_3 a $PLC\gamma$ (Tong, Chu et al. 2004).

1.2.3.3 TRPC3

Bohatý výskyt TRPC3 byl potvrzen v mozku a buňkách hladkého a srdečního svalu (Riccio, Medhurst et al. 2002; Clapham 2003). TRPC3 patří do skupiny receptorů aktivovaných DAG cestou jako všechny iontové kanály TRPC rodiny i TRPC3 je schopen přímo interagovat s kalmodulem a inositoltrisfosfátem (IP_3) díky CIBR vazebné doméně (Wedel, Vazquez et al. 2003; Lemonnier, Trebak et al. 2008). Popsána byla aktivace iontového TRPC3 pomocí tzv. purinoceptorů. Modulace TRPC3 cestou IP_3 vede k zúžení arterií v mozkové tkáni (Xi, Adebisi et al. 2008) a navíc pomáhá při

tvorbě nových synaptických spojů u neuronové buňky (Amaral and Pozzo-Miller 2007). Regulací influxu Ca^{2+} iontů skrz membránu dochází k depolarizaci plazmatické membrány u endoteliálních buněk (Ahmmed and Malik 2005) a k vazokonstrikci buněk hladkého svalstva (Kwan, Huang et al. 2007).

1.2.3.4 TRPC4

TRPC4 se nejčastěji nachází v membránách endoteliálních buněk a v buňkách hladkého svalstva (Beech 2005; Tirupathi, Ahmmed et al. 2006). Přítomnost byla zjištěna též v různých oblastech mozku (Zechel, Werner et al. 2007), ledvin, nadledvinek (Philipp, Trost et al. 2000; Freichel, Vennekens et al. 2005) a v Cajalových intersticiálních buňkách (ICC) starajících se o uklidňování střevní peristaltiky (Kim, So et al. 2006). TRPC4 patří mezi neselektivní iontové kanály účastníci se transdukce nervového signálu žaludečního hladkého svalstva po stimulaci muskarinem (Lee, Jun et al. 2005). Experimenty na myších s knockoutovaným genem TRPC4 ukázaly funkční vliv iontových kanálů TRPC4 na distribuci a vstup Ca^{2+} iontů do endoteliálních buněk, které řídí správnou šířku cév ovlivňující vazorelaxaci a vazokonstrikci (Freichel, Suh et al. 2001).

1.2.3.5 TRPC5

TRPC5 podobně jako TRPC4 má zvýšenou expresi ve více tkáních včetně mozku (Hofmann, Schaefer et al. 2000). V centrální nervové soustavě tvoří multimerní kationtové kanály s TRPC1 a společně mají důležitou roli při vývoji mozkové tkáně (Strubing, Krapivinsky et al. 2001; Strubing, Krapivinsky et al. 2003). V neuronech TRPC5 asociuje se synaptotagminem a stathminem-2. Vezikulárním transportem je dopravován až do růstových vrcholů neuritu (Greka, Navarro et al. 2003). Zmíněný vezikulární transport TRPC5 je aktivován pomocí epidermálního růstového faktoru (EGF) závislého na přítomnosti fosfatidylinositol-3-kinázy (PI_3K), GTPázy s podjednotkou Rac1 a fosfatidylinositol-4-fosfát-5-kinázy ($\text{PIP}(5)\text{K}$) (Bezzarides, Ramsey et al. 2004). TRPC5 reguluje délku nárůstu hipokampálního neuritu a následně morfologii neuronového růstového kuželu. TRPC5 může být regulován i vnějšími faktory jako jsou například trojmocné La^{3+} ionty nebo pomocný protein EBP50

(Obukhov and Nowycky 2008). Přítomnost TRPC5 a jeho aktivace Gproteiny spárovanými s neurálními receptory byla popsána u amygdaly, která určuje chování při emočních prožitcích a strachu (Riccio, Li et al. 2009).

1.2.3.6 TRPC6

Tomuto členu TRPC rodiny je věnována kapitola 1.3.

1.2.3.7 TRPC7

Posledním z rodiny TRPC je člen TRPC7, u kterého dosud jeho funkce není známa. Je velmi exprimován v mozkové tkáni, kde se váže a podílí na aktivaci skupiny 1mGlu-receptorů v neuronech, které uvolňují acetylcholin (Berg, Sen et al. 2007). Jsou hypotézy, že TRPC7 se účastní regulace Ca^{2+} iontů při aktivaci angiotensinu 1.typu závislé na přítomnosti kalcineurinu. Touto cestou se TRPC7 může podílet na apoptóze myokardového svalu, což vede k srdečnímu infarktu (Sato, Tanaka et al. 2007).

1.3 TRPC6

TRPC6 je neselektivní kationtový kanál 6x více propustný pro Ca^{2+} než Na^+ . Exprimovaný homotetramerní kanál v nativní formě má typickou volt-ampérovou charakteristiku a je přímo aktivován pomocí druhého posla diacylglycerolu (DAG). TRPC6 proteiny jsou také regulovány specifickými tyrosin nebo serin fosforylázami a fosfoinositoly. TRPC6 hraje důležitou roli ve mnoha fyziologických mechanismech, což potvrdil jeho specifický expresní projev při analýzách s knockoutovaným myším genem TRPC6. Kontrakce buněk hladkého svalstva je vyvolávána vstupem sodných iontů přes membránu do lumen buňky. TRPC6 kanály a napětím aktivované vápníkové kanály řídí membránovou depolarizaci. Propustnost pulmonárních endotheliálních buněk závisí na TRPC6 a může dokonce způsobovat lokální ischemii při edému plic. TRPC6 byl také identifikován jako nepostradatelná složka podocytů v ledvinové tkáni a navíc má důležitou roli v ochraně neuronů po mozkové ischemii. Další funkce TRPC6 v imunitních a krevních buňkách zůstávají nepopsané. V poslední době se podařilo najít

blokátory TRPC6, což může být nápomocné pro terapeutické přístupy u nemocí, při kterých je TRPC6 vysoce aktivován.

1.3.1 Gen a protein

Nezkrácenou cDNA TRPC6 se podařilo izolovat z myších mozkových buněk (Boulay, Zhu et al. 1997), zatímco lidský TRPC6 byl naklonován z placentárních buněk (Hofmann, Obukhov et al. 1999). Gen TRPC6 je umístěn na chromozomu 11q21-q22 a obsahuje 13 exonů (D'Esposito, Strazzullo et al. 1998). Myší verze má stejný počet exonů a je lokalizována na 9 chromozomu. Celkový protein se skládá z 931 aminokyselin (lidský), respektive 930 aminokyselin (myší).

Předpokládaná transmembránová struktura je podobná ostatním TRP kanálům s intracelulárně orientovanými N- a C- terminálními konci, s 6ti transmembránovými segmenty a pórem tvořeným hydrofobní smyčkou mezi 5. a 6. segmentem. Čtyři monomerní jednotky se podílí na tvorbě funkčního tetrameru membránového kanálu, který ve svém centru je průchodný pro ionty skrz membránu.

Glykosylační studie odhalila dvě potenciální místa v první a druhé extracelulární smyčce (Asn473, Asn561), která mohou být glykosilována. Glykosilace je jedním faktorem pro správné formování a fungování receptoru TRPC6 (Dietrich, Mederos y Schnitzler et al. 2003). Mutace Asn561 na Gln561 zabraňuje glykosylaci a je dostatečná pro zvýšení basální aktivity TRPC6 (Dietrich, Mederos y Schnitzler et al. 2003).

Funkční charakteristiky TRPC6 tetramerních jednotek vyprodukovaných různými buněčnými liniemi nemusí odpovídat jejich fyziologickým vlastnostem „*in vivo*“, protože TRPC6 v přirozeném prostředí může utvářet složené iontové kanály, tzv. heteromerní komplexy. Různé experimentální přístupy došly k závěrům, že TRPC6 sestavuje homo i heterotetramery v rámci členů TRPC podrodiny TRPC3/6/7 (Hofmann, Schaefer et al. 2002). Tyto výsledky potvrdila i systematická imunoprecipitační studie TRPC proteinů izolovaných ze synaptosomů (Goel, Sinkins et al. 2002). Další kombinace heterotetramerů s TRPC1 společně TRPC4/5 a TRPC6 byly identifikovány v HEK293 buňkách, v embryonálních mozkových tkáních na rozdíl od dospělé mozkové tkáně (Strubing, Krapivinsky et al. 2003). Důkaz pro TRPC1/3, TRPC1/6 a podobnou heteromerní kombinaci TRPC1/7 byl získán elektrofyziologickou

analýzou příslušných volt-ampérových charakteristik u pozorovaných heteromerních komplexů iontových kanálů v různých expresních systémech (Storch, Forst et al. 2012). Ve shodě s kombinatorními pravidly se zdá, že vzniklý proud TRPC4 a TRPC6 koreluje s myším kationtovým kanálem v buňkách hladkého svalstva ve střevě, avšak netvoří heteromerní kationtové komplexy, ale fungují nezávisle na sobě (Tsvilovskyy, Zholos et al. 2009).

Obecně platí, že v živých tkáních se TRPC receptorové komplexy mohou seskupovat do supramolekulárních signálních komplexů s dalšími adaptorovými proteiny. Vzniklé uskupení proteinů se nazývá *signálplex*. Takovéto komplexy byly pozorovány u TRPC6, např. v nervových buňkách PC12, kde byly TRPC6 kanály soustředěny okolo proteinkinázy C, proteinu vázajícího FK-506 a calcineurinu případně kalmmodulinu (Kim and Saffen 2005). Proteomickým přístupem byly protilátkami anti-TRPC5 a anti-TRPC6, potvrzeny signálplexy TRPC5 a TRPC6 obsahující několik cytoskeletárních proteinů a také cytoplazmatickou Na^+/K^+ -ATPázovou pumpu (NKA) v ledvinových buňkách exprimovaných HEK293 linií. Překvapivě TRPC5 a TRPC6 signálplexy nebyly potvrzeny v podobných komplexech s NKA pumpou a cytoskeletárními proteiny v mozkových buňkách (Goel, Sinkins et al. 2005).

Nicméně stále zůstává debata interakce TRPC kanálů s proteiny Orai1 a taktéž s STIM proteiny, jakož to nezbytná interakce pro řízený vstup Ca^{2+} iontů (SOCE). Zatímco TRPC6 není schopný interakce s STIM proteiny přímo, pouze nepřímo v heteromerních komplexech s TRPC1 (Yuan, Zeng et al. 2007), další výzkumy potvrzují TRPC6/Orai1 interakci v HEK293 buněčném systému, neboť stabilní exprese TRPC6 v buňkách signifikantně zvyšuje SOCE proudové charakteristiky (Liao, Erxleben et al. 2008; Liao, Plummer et al. 2009). Aktivace TRPC kanálů pomocí STIM proteinů případně Orai1 kanálů byla zpochybněna, protože STIM proteiny nemají vliv na TRPC6 proudovou charakteristiku ve svalových buňkách (DeHaven, Jones et al. 2009). To upevnilo názor, že TRPC a Orai1-STIM signalizace se objevuje u jiných plasmamembránových domén (DeHaven, Jones et al. 2009). V současné době výzkumy naznačují, že tento zásoby řídicí komplex TRPC6 STIM Orai1 může existovat u lidských krevních destiček (Jardin, Gomez et al. 2009; Berna-Erro, Galan et al. 2012).

Čtyři akryrinové domény umístěné na N-terminálním konci TRPC6 jsou typickým zástupcem pro protein-protein interakce. V kvasinkových hybridních systémech druhá akryrinová doména váže MxA, protein z dynaminové rodiny. MxA působí na aktivitu TRPC6 GTP-závislým způsobem (Lussier, Cayouette et al. 2005).

TRPC6 obsahuje konzervovanou sekvenci aminokyselin tzv. „TRP box“ (sekvence EWKFAR), která je identická pro celou TRPC rodinu. Na C-terminálním konci se nalézá IP₃ receptor vázající doména (Boulay, Brown et al. 1999), která se překrývá s vazebným místem pro kalmodulin (Zhang, Tang et al. 2001) a regionem interagující s fosfoinositolem (Kwon, Hofmann et al. 2007).

1.3.2 Vlastnosti iontového kanálu TRPC6

TRPC6 je Ca²⁺ propustný neselektivní kationtový kanál vykazující konduktivitu 28-37 pS. Poměr iontové propustnosti P_{Ca}/P_{Na} odpovídá 6 (Hofmann, Obukhov et al. 1999; Dietrich, Mederos y Schnitzler et al. 2003; Shi, Mori et al. 2004). Tyto znaky TRPC6 odlišují od jinak velmi podobného TRPC3, který má nižší selektivitu pro Ca²⁺ s iontovým poměrem 1,1 a mírně vyšší vodivostí 60-66 pS (Owsianik, Talavera et al. 2006). Nicméně Ca²⁺ ionty přispívají jen malým procentem (4%) k celkovému buněčnému proudu buněk linie HEK293, který byl produkován TRPC6 v přítomnosti extracelulárního Na⁺ (Estacion, Sinkins et al. 2006). Použitím heteromerní kombinace blokátorů pro napětím řízené kalciové kanály dojde k úplnému přerušení influxu Ca²⁺ iontů po předchozí aktivaci TRPC6 v buňkách hladkého svalstva (Soboloff, Spassova et al. 2005). To podporuje model zdůrazňující Na⁺ vstup skrz TRPC6 kanály, což následně depolarizuje membránu a aktivuje kalciové kanály řízené napětím, které jsou odpovědné za podstatnou část Ca²⁺ influxu (Gudermann, Mederos y Schnitzler et al. 2004).

V poslední době se ukázalo, že TRPC6 také vytváří Zn²⁺ řídicí kanály, které slouží k akumulaci intracelulárních Zn²⁺ iontů v HEK293 buňkách (Gibon, Tu et al. 2011). Zda kanál přispívá k Zn²⁺ homeostázi v lidských tkáních zůstává stále neprokázáno.

TRPC6 je receptor řídicí se striktně nízkou bazální aktivitou na rozdíl od TRPC3, pro který je naopak charakteristická bazální aktivita vysoká. Jak bylo popsáno

dříve (Obr.3.;kapitola 1.2.1) dvojitá glykosylace je důležitým znakem klidové aktivity kanálu TRPC6 (Dietrich, Mederos y Schnitzler et al. 2003).

Přestože se lidský TRPC6 zdá být produkován nejvíce v plicích a placentárních buňkách, jeho přítomnost byla objevena i v ledvinách, slezině a vaječnicích (Hofmann, Schaefer et al. 2002). Blotovací technikou byl TRPC6 u myši lokalizován kromě plic také v mozkové tkáni (Boulay, Zhu et al. 1997).

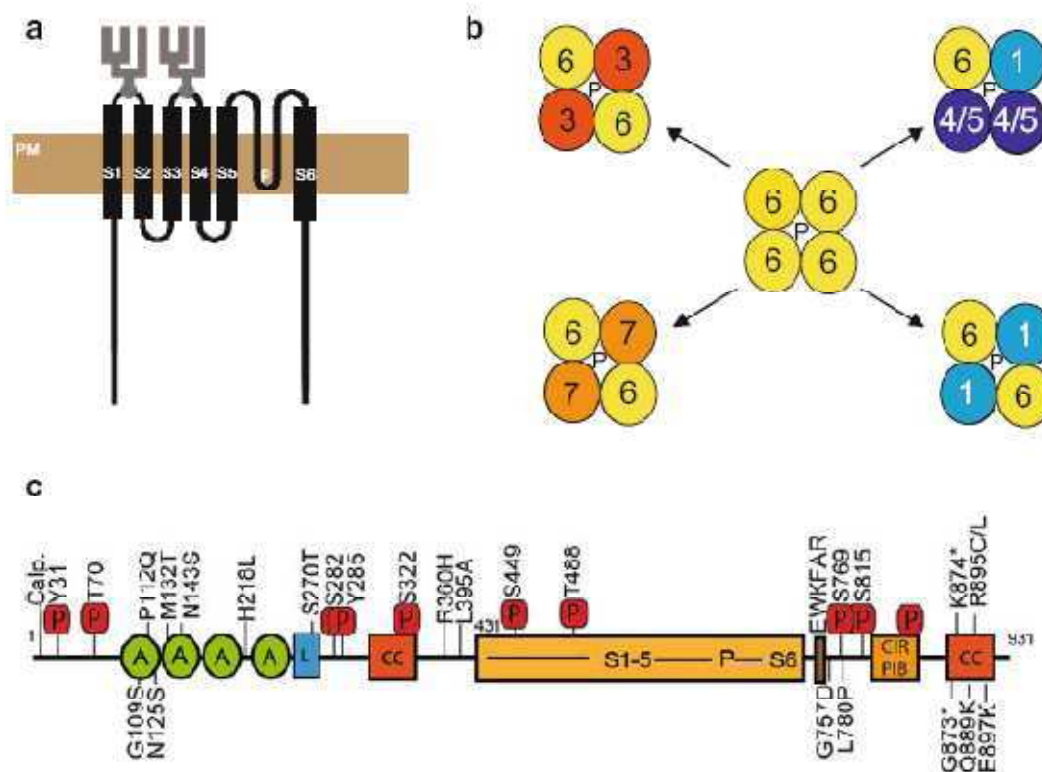
Obecně byl TRPC6 nalezen v tkáních obsahující hladké svalové buňky jako jsou právě plíce, žaludek, tlusté střevo, střevo, jícen a děloha (Beech, Muraki et al. 2004). TRPC6 je produkován v ledvinách, konkrétně byl zjištěn v glomerulech analýzou pacientů s fokální segmentální glomerulosklerózou (FSGS) (Mottl, Lu et al. 2013).

1.3.3 Regulace TRPC6

TRP byly původně popsány jako iontové kanály selektivní pro Ca^{2+} a aktivované vyprázdněním intracelulárních Ca^{2+} zásob (SOC = store-operated channel). Po jejich funkční charakterizaci a rozdělení se ukázalo, že pro všechny TRPC kanály to není pravda. TRPC kanály vykazují mírnou Ca^{2+} selektivitu ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 0,5-9$) a navíc u některých členů TRPC3/6/7 dochází k aktivaci působením molekul druhých posílů (diacylglycerolem, produkováným receptorově aktivovanou fosfolipázou C) bez zásahu vnitřních iontových zásob, čili receptorově kontrolovanou aktivací (ROC = receptor operated channel) (Hofmann, Obukhov et al. 1999; Mori, Okada et al. 1999).

Extracelulární Ca^{2+} má komplexní vliv na aktivitu TRPC6. Vysoká extracelulární koncentrace ($[\text{Ca}]_{\text{EX}} > 2\text{mM}$) inhibuje aktivitu TRPC6 vyvolanou vasopressinem v krysích buňkách A7r5 linie. Snížení koncentrace $[\text{Ca}]_{\text{EX}}$ na 50-200 μM usnadnilo opětovný vznik kationtových proudů modulovaných TRPC6 a následující úplné odstranění Ca^{2+} iontů vedlo k celkovému poklesu proudu (Jung, Strotmann et al. 2002). Tato pozorování aktivace TRPC6 a další modulaci pomocí extracelulární koncentrace Ca^{2+} zahrnují fosforylaci kalmodulin dependentní kinázy II (Shi, Geshi et al. 2013). Podobný jev není společný u nejvíce sekvenčně příbuzného člena, TRPC7 kanálu (Shi, Mori et al. 2004).

Vazba fosfatidylinositolů, speciálně fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu (PIP₃) byla popsána ve vazebném místě pro kalmodulin (Kwon, Hofmann et al. 2007). Mutace v tomto vazebném regionu, který byl původně identifikován jako CIBR kalmodulin/IP₃receptor vazací region, snížily schopnost vazby k PIP₃, zvýšily afinitu ke kalmodulinu a též redukovaly proud modulovaný kanálem TRPC6. Naopak mutace zvyšující schopnost vazby k PIP₃ vedla k omezení afinity ke kalmodulinu a zvedla TRPC6 proudy, zatímco trojitá mutace R853Q K860Q R861Q vedla k omezení interakce s oběma vazebnými partnery (Kwon, Hofmann et al. 2007). TRPC6 je tedy iontový kanál s komplexní regulací intracelulární, extracelulární koncentrací Ca²⁺, kalmodulinem a též fosfatidylinositoly.



Obr.5.: Schematické zobrazení sekvence TRPC6

A) Struktura receptoru TRPC6 s vyznačenými glykosylačními místy (šedá barva) a uskupením transmembránových segmentů (S1-S7)

B) TRPC rodina vytváří nativní multitetramerní komplexy. Naznačeny jsou komplexy, které se podařilo identifikovat imunoprecipitačními metodami nebo pomocí rozboru volt-ampérových charakteristik.

C) Sekvence TRPC6 receptoru s vyznačenými potenciálními fosforylačními místy (červené R), včetně typických strukturních znaků – ankyrinová doména (zelené A), neuspořádaná oblast „coiled-coil“ (červené CC), transmembránové segmenty S1-S5, konzervovaný úsek zvaný TRP box (hnědá barva), CIRPIB doména zodpovědná za interakci s kalmodulinem, IP₃ a PIP₂ (Nilius and Flockerzi 2014).

TRPC6 a TRPC7 se i přes velkou podobnost (sekvenční homologie cca 70%) liší výskytem. TRPC6 je nejvíce exprimován v mozku a plicích na rozdíl od TRPC7, jehož exprese je největší v ledvinách a hypofýze (Riccio, Medhurst et al. 2002; Montell 2005). Aktivace často vyžaduje činnost fosfolipázy C, která pomocí kinázových faktorů produkuje diacylglycerol DAG, který otvírá iontový kanál. Vodivost samotného kanálu TRPC6 je 35pS a má unikátní proudovou charakteristiku pro TRPC podrodinu bez dalšího sekundárního nárůstu vodivosti (Hofmann, Obukhov et al. 1999). Hlavní funkcí TRPC6 je usnadňování vstupu Ca²⁺ iontů do buněk, například u krevních destiček je aktivován kaskádou, kterou spouští trombin (Haddock, Zhu et al. 2002). V hladkém svalstvu kontroluje vasokonstrikci cév a kooperuje s vaskulární α-1 adrenoceptorovou podjednotkou (Inoue, Okada et al. 2001; Jung, Strotmann et al. 2002). Pokusy s knockoutovaným genem pro TRPC6 potvrdily vliv tohoto iontového kanálu na distribuci Ca²⁺, krevní tlak a vasokonstrikci cév v hladkém svalu. Správnou distribuci Ca²⁺ iontů lze částečně opravit správnou funkcí TRPC3 kanálu (Dietrich, Mederos et al. 2005). Nakonec funkce TRPC6 je esenciální pro epiteliální buňky ledvinových podocytů, které jsou zodpovědné za filtraci glomerulární basální membrány (Reiser, Polu et al. 2005; Graham, Ding et al. 2007; Ilatovskaya and Staruschenko 2013).

1.4 Rodina S100 proteinů

S100 proteiny jsou velká rodina cytoplazmatických a extracelulárních proteinů schopných vázat molekuly Ca²⁺ iontů. Jsou to malé proteiny produkované v různých tkáních. Byly nalezeny výhradně u obratlovců. Bylo zatím identifikováno nejméně 24 různých S100 proteinů u člověka. Přestože nemají žádnou enzymatickou funkci, uplatňují se jako signální proteiny reagující na změnu hladiny intracelulární koncentrace

vápenatých iontů. Jsou schopny aktivovat další vazebné partnery a jejich modulací se nepřímo podílí na tvorbě biologické odpovědi. Vazbou na efektorové proteiny jsou schopny měnit jejich enzymovou aktivitu, schopnost interakce s dalšími kompartmenty, a tímto způsobem regulují různé buněčné procesy. Jejich vliv byl potvrzen například u dynamiky cytoskeletonu, buněčného růstu a diferenciaci buněk, avšak nejdůležitější působení S100 proteinů je u homeostázy Ca^{2+} iontů a jejich distribuce v buňce.

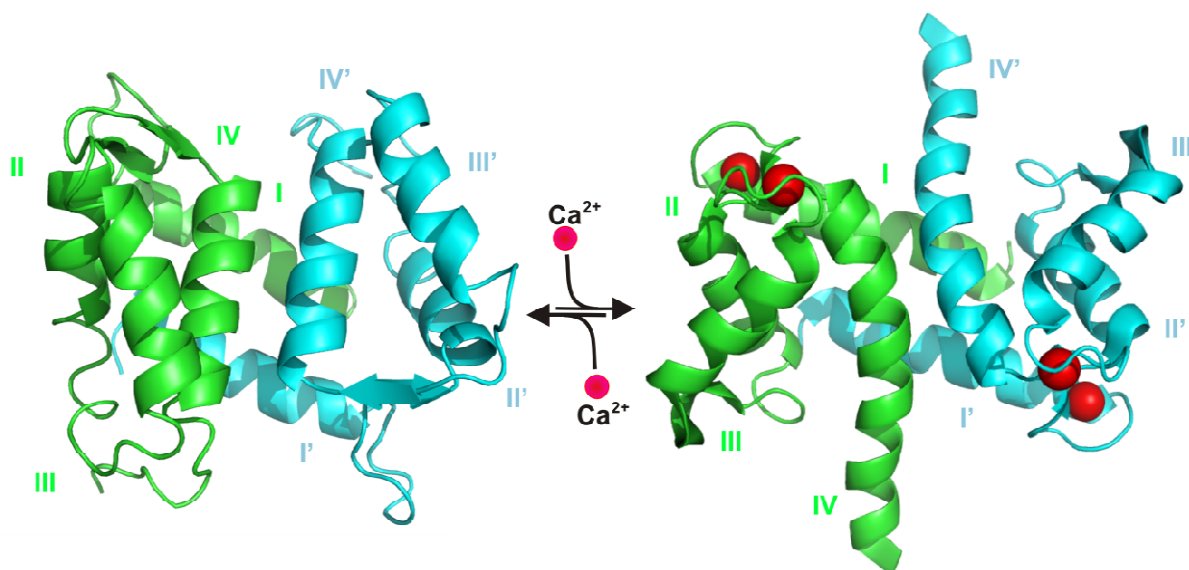
U členů S100 rodiny se projevuje až 65% sekvenční homologie. Typickým znakem této rodiny proteinů je vysoký stupeň konzervovanosti aminokyselinové sekvence a prostorové struktury. Obsahuje dva tzv. „*EF-hand*“ motivy zodpovědné za vazbu Ca^{2+} .

U velkého počtu závažných nemocí jako jsou rakovina, Downův syndrom, Alzheimerova choroba, kardiomyopatie, lupénka a dalších byla zjištěna nesprávná funkce S100 proteinů. Důležitost S100 proteinů v diagnostice tak narůstá a jsou používány jako terapeutické markery.

1.4.1 Struktura S100

Během posledních let byla pomocí NMR a rentgenové krystalografie zjištěna 3-D struktura S100 proteinů v přítomnosti a absenci iontů Ca^{2+} (S100 a apoS100). Vykrytalovány byly i proteiny S100 s vazebnými partnery. V nativní formě jsou schopny S100 proteiny existovat jako molekula dimeru. Jednotlivé monomerní jednotky obsahují po jednom „*EF-hand*“ motivu, které se liší od sebe svou vazebnou schopností. *EF-hand* motiv v N-terminální části se skládá z helixu I, pseudo vazebného místa a helixu II, který je oddělen flexibilním spojovacím linkerem od C-konce, na kterém se nachází druhý „*EF-hand*“ motiv, tvořený helixem III, Ca^{2+} vazebným místem a helixem IV (Obr.6.). Vazebný motiv pro vápníkové ionty na C-konci odpovídá úseku 12 aminokyselinových reziduí a jeho chování je podobné jako u kalmodulinu nebo troponinu C se srovnatelnou disociační konstantou k Ca^{2+} 10-50 μM . Naopak pseudo „*EF-hand*“ motiv na N konci je tvořen 14 aminokyselinami, váže Ca^{2+} iont se slabší afinitou K_D odpovídá 200-500 μM . Navíc navázání iontu do místa na N konci provází větší konformační změny než u vazebného místa na C konci, kdy helix III je značně

odchýlen od helixu IV, tím dojde k odkrytí hydrofobní oblasti, která je zodpovědná za interakci k dalším proteinům.



Obr.6.: Strukturní model S100A1 proteinu

Vlevo je zobrazen model 3-D struktury apo-S100A1 (bez navázaných Ca²⁺ iontů), který se skládá ze dvou monomerních jednotek (zelená, modrá). Po navázání vápenatých iontů (červeně jsou vyznačeny molekuly Ca²⁺) dochází ke konformačním změnám struktury – model vpravo. Jednotlivé helixy monomerních jednotek jsou označeny římskými číslicemi I-IV. První vazebné místo pro Ca²⁺ iont se nachází mezi I - II helixem, druhé mezi III - IV helixem. Vychýlení III helixu od helixu IV odkrývá hydrofobní oblast, která má na starosti interakci s vazebnými partnery.

Přestože proteiny S100 vykazují jistou konzervativnost a homologii v aminokyselinové sekvenci a 3-D struktuře, jednotliví členové S100 rodiny se od sebe odlišují různými biochemickými a fyzikálními vlastnostmi. Kromě afinity k Ca²⁺ iontům byla popsána afinita pro jiné dvojmocné kovové ionty, např. jsou Zn²⁺ nebo Cu²⁺, které mají vliv na interakci s cílovými partnery (Heizmann, Fritz et al. 2002). V některých případech u jednotlivých členů rodiny lze rozlišit příspěvek vazby právě zmíněných kovových iontů na různé funkce těchto proteinů. Vliv Zn²⁺ iontů byl prokázán u S100B, který moduluje interakci s tzv. CapZ proteinem a TRTK peptidem. S100B je schopen se vázat na velký fosfoprotein AHNAK za přítomnosti Zn²⁺, které se

ovšem inkorporují do odlišného místa než Ca^{2+} ionty (Gentil, Delphin et al. 2001). Zn^{2+} vazebná místa byla zjištěna i u dalších členů S100A7, S100A8, S100A9, S100A12 a jejich relativně vysoká afinita odpovídá disociačním konstantám v rozmezí $K_D = 0,1-1 \mu\text{M}$. Byla prokázána i vazba S100A5 s Cu^{2+} ionty (Nishikawa, Lee et al. 1997; Schafer, Fritschy et al. 2000).

1.4.2 S100A1

S100A1 je hojně exprimován buňkami kosterního svalstva, kardiomyocyty a do jisté míry jej lze nalézt i v neuronech, které jej neprodukují (Donato 2001). V buňkách je S100A1 produkován jako cytoplazmatický protein, který je schopen asociovat s membránovými proteiny cytoskeletárními komponenty a mitochondriemi.

Promotor genu S100A1 je regulován v obráceném směru transkripčními faktory, které jsou společné i pro receptory vázající G-protein a protein kinázu C (PKC) (Kiewitz, Lyons et al. 2000). Proto u kardiomyocytů při stálé stimulaci angiotenzinem II, fenylferinem nebo podobnými agonisty PKC dochází ke snížení mRNA kódující S100A1. Tato stálá stimulace může způsobit až hypertrofii srdečních buněk (Most, Seifert et al. 2006).

V buňkách srdeční tkáně S100A1 interaguje s Ca^{2+} -ATPázou sarkoplazmatického retikula (SERCA), ryanodinovým receptorem 2 (RyR2) patřícím mezi iontové kanály. S100A1 tak přispívá k uvolňování intracelulárních zásob Ca^{2+} iontů a kontroluje kontraktilitu srdečního svalu. Další možností je kooperace se sarkomery a mitochondriemi kardiomyocytu, čímž dochází ke snižování pasivního tlaku před kontrakcí (Rohde, Ritterhoff et al. 2010). Nedostatek S100A1 vede k abnormálnímu obsahu Ca^{2+} iontů v sarkoplazmatickém retikulu. Porušení cirkulace S100A1 v buňce přispívá ke snížení srdečního výkonu, který může vyústit až k srdečnímu selhání (Volkers, Rohde et al. 2010). Dodáním genu S100A1 pomocí adenovirového vektoru do buňky lze zvrátit kontraktální dysfunkci a předejít selhání myokardu (Most, Pleger et al. 2004).

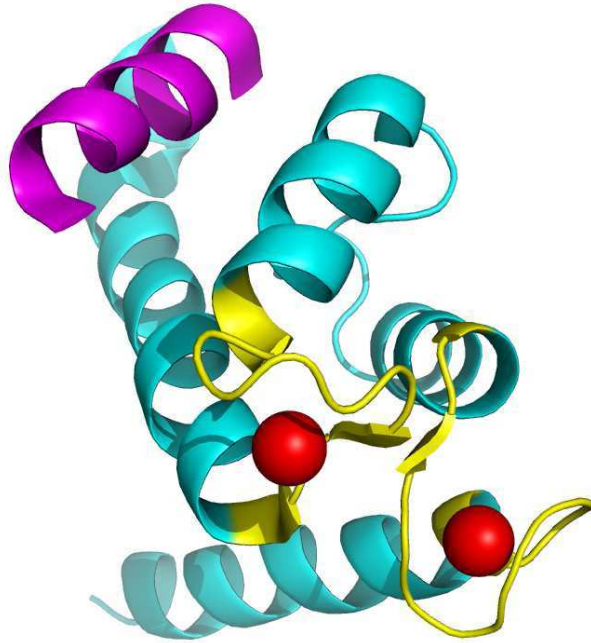
S100A1 ve svalových buňkách příčně pruhovaného svalstva se váže na ryanodinový receptor 1 (RyR1) na rozdíl od kardiomyocytu a moduluje jeho funkci při

excitaci svalové kontrakce buňky (Prosser, Wright et al. 2008). S100A1 se také váže na sarkomerické kinázy a na velký protein titin, který je zodpovědný za pasivní elasticitu svalu. S100A1 stimuluje guanylátcyklázu navázanou na membráně fotoreceptorů zapojených do mechanismu adaptace na šero. V energetickém metabolismu pozitivně ovlivňuje fruktóza-1,6-bisfosfát aldolázu a je schopen inhibovat fosfoglukomutázu případně různé formy glykogenfosforylázy (Donato 2003).

S100A1 mohou působit i extracelulárně, kdy je vylučován kardiomyocyty při srdeční ischemii. V okolních ventrikulárních buňkách zvyšuje influx Ca^{2+} iontů (Reppel, Sasse et al. 2005). Dostává se tímto způsobem do neuronů horního krčního ganglionu sympatiku, kde prodlužuje a zesiluje akční potenciály napětí v neuronech vzniklé díky Ca^{2+} iontům (Hernandez-Ochoa, Prosser et al. 2009). S100A1 tvoří komplex i fosfokinázou A a moduluje aktivitu Ca^{2+} kanálů L typu (Cav1), které jsou aktivovány pomocí PKA.

1.4.3 Proteiny S100 a jejich vazba na iontové kanály

Vápník vázající proteiny z rodiny S100 mohou ovlivňovat i některé iontové kanály, které se účastní různých buněčných signálních odpovědí nebo mechanismů. Jedním z nich je ryanodinový receptor 1 (RyR) ve svalových buňkách kontrolující homeostázu Ca^{2+} iontů v buňce (Wright, Prosser et al. 2008). RyR je membránový iontový kanál kontrolující zásoby Ca^{2+} v endoplazmatickém retikulu. V aminokyselinové sekvenci RyR je konzervovaný region (Obr.7), který je kompatibilní s vazebným motivem pro Ca^{2+} vázající proteiny. NMR studie potvrdila afinitu RyR receptoru po konformačních změnách způsobených navázáním Ca^{2+} iontů jak k S100A1 tak i ke kalmodulinu. Při nízkých koncentracích Ca^{2+} S100A1 aktivuje RyR a urychluje uvolnění Ca^{2+} iontů z endoplazmatického retikula ve svalové buňce.



Obr.7.: Model komplexu S100A1 a ryanodinového receptoru

Aktivovaný protein S100A1 (modrá barva) mění svou konformaci po navázání vápenatých iontů (červené barva) do obou vazebných motivů (zvýrazněno žlutou barvou). Konformační změny zpřístupní úsek III. a IV. helixu, který interaguje s ryanodinovým receptorem (fialová barva) (Wright, Prosser et al. 2008).

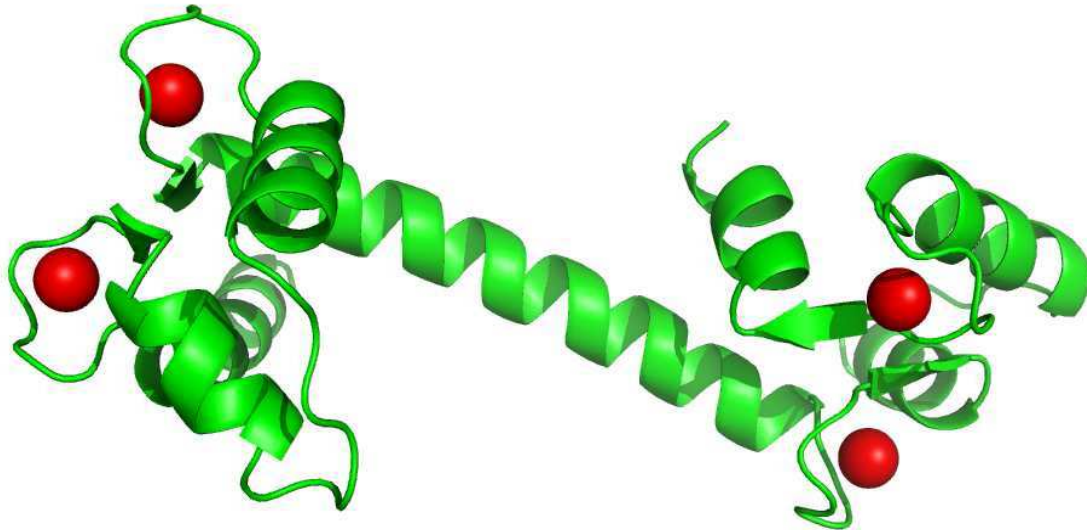
Podobná kompetice o vazebné místo pro kalmodulin byla popsána u TRPM3 propustného pro Ca^{2+} ionty, který má funkci jako termosenzorický iontový kanál (Holakovska, Grycova et al. 2012).

S100A10 (známý jako p11), který má v obou „*EF hand*“ motivech delece a substituce v AMK sekvenci, jež snižují senzitivitu k Ca^{2+} iontům, se vyskytuje jako heterotetramerní komplex s annexinem 2. Společně tvoří pomocný proteinový komplex, který zprostředkovává správný transport iontových kanálů TRPV5 a TRPV6 a jejich lokalizaci na membráně. Pomocný proteinový komplex byl potvrzen hybridním systémem v kvasinkách (van de Graaf, Hoenderop et al. 2003).

1.5 Kalmodulin

Kalmodulin je malý protein o velikosti 16,7kDa, který je složen ze 148 AMK. Díky kyselému pI (pI = 4,1) je velmi dobře rozpustný. Sekvence kalmodulinu je vysoce konzervována během evolučního vývoje u eukaryotních organismů. Hojně se vyskytuje v mozkové tkáni, kde dosahuje v buňkách intracelulární koncentrace 1-10mM. Více jak polovina kalmodulinu je asociována s membránami a zbytek zůstává v rozpustné formě v cytoplasmě a uvnitř buněčného jádra (Santella and Carafoli 1997; Toutenhoofd and Strehler 2000).

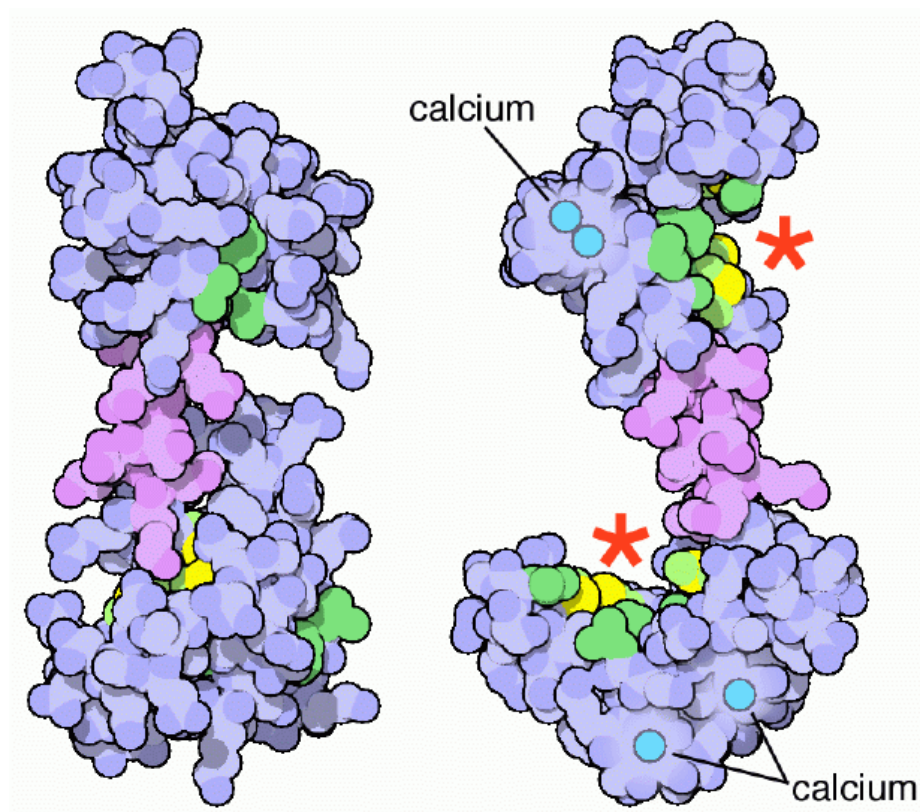
Dosud je známo přes 40 typů enzymů nebo kanálů, které kalmodulin aktivuje a přes 100 proteinů, se kterými je schopen interakce. Na C a N terminálním konci obsahuje globulární domény, které jsou spojeny flexibilním centrálním linkerem (Obr.8.). Obě domény obsahují „*EF-hand*“ motiv, který má strukturu α -helix-smyčka- α -helix, který je typický pro schopnost vazby Ca^{2+} iontů. Kalmodulin v nativní formě tvoří dimer a celkově je schopen vázat až 4 vápenaté ionty. V nepřítomnosti vazebných partnerů pro kalmodulin jsou nejdříve navázány Ca^{2+} ionty na 2 vazebná místa na C terminální doméně a následně se zaplňují vazebná místa na N terminální doméně s disociačními konstantami K_D 10^{-6}M , respektive 10^{-5}M . V přítomnosti vazebných partnerů pro kalmodulin tyto 4 vazebná místa celkově spolupracují a velmi zvyšují afinitu proteinu k Ca^{2+} iontům. Výsledkem je silná vazba navázaných Ca^{2+} iontů včetně zvýšení afinity k vazebným partnerům kalmodulinu (K_D se pohybuje v rozmezí 10^{-7} - 10^{-11}M). Utvoření komplexu s Ca^{2+} ionty je prvním krokem pro vznik kalmodulinem řízené odpovědi na podněty, které zvyšují koncentraci Ca^{2+} iontů.



Obr.8.: Model kalmodulinu

Model kalmodulinu tvoří dvě globulární domény spojené proteinovým můstkem. Krystalová struktura kalmodulinu je podobná jednoruční čince. Na terminálních koncích N a C byly identifikovány motivy α -helix - smyčka - α -helix, který označován jako „*EF hand*“ motiv zodpovědný za vazbu Ca^{2+} iontů (červená barva) kalmodulinem. V každé z globulárních domén se nachází dva vazebné motivy, kterými je molekula kalmodulinu schopna interakce se čtyřmi vápenatými ionty.

Kalmodulin váže Ca^{2+} ionty v rozpětí okolo fyziologické koncentrace s vazebnou konstantou K_D $5 \cdot 10^{-7}$ až $5 \cdot 10^{-6}$ M, ale jeho afinita k Ca^{2+} iontům je o mnoho vyšší pokud je v komplexu s enzymem, či jiným vazebným kofaktorem. CaM je schopen navázat maximálně 4 ionty Ca^{2+} , avšak NMR studie ukázala, že kalmodulin je schopen existovat v roztoku dokonce pouze s navázanými ionty Ca^{2+} do vazebných míst na C terminálním konci (Klevit, Dalgarno et al. 1984). Při navázání 4 molekul Ca^{2+} se kalmodulin stává prostorově roztáhlejší a každý pár „*EF hand*“ motivu se ještě více otvírá a zpřístupňuje hydrofobní část schopnou vázat cílové proteiny (Obr. 9.) (Babu, Sack et al. 1985; Wriggers, Mehler et al. 1998). Klasické hromadné krystalizační a NMR studie ukázaly, že dva laloky kalmodulinu obklopují cílový protein hydrofobními vazbami pomocí vodíkových můstků s glutamátovými zbytky v místě EF motivu, kde se nachází smyčka s navázaným Ca^{2+} iontem (Ikura, Clore et al. 1992; Meador, Means et al. 1992).



Obr.9.: Kalmodulinové vazebné místo pro cílové proteiny

Prostorový model kalmodulinu (modrá barva) s odhaleným vazebným regionem (červená hvězda), který má hydrofobní povahu (žlutá barva) a obsahuje aminokyseliny nesoucí negativní náboj (zelená barva). Fialovou barvou je zobrazen helixový linker, světle modrou jsou popsány molekuly vápenatých iontů (Goodsell, Dutta et al. 2015)

1.5.1 Vazebné principy kalmodulinu a jeho cílových partnerů

Primární struktura cílových partnerů kalmodulinu obsahuje často bazické amfolytické α -helixy (BAA) s hydrofobním okolím, ale s pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky. Tyhle rysy neurčují přesné pořadí aminokyselin v sekvenci BAA segmentů, přesto lze rozeznat některé vazebné vzory, které jsou pro kalmodulin důležité, jako jsou například motivy 1-5-10 a 1-8-14 (Rhoads and Friedberg 1997; Jurado, Chockalingam et al. 1999; Yap, Kim et al. 2000). Motiv 1-5-10 byl rozpoznán u kalmodulinem aktivovaných kináz typu I, II a u tzv. MARCKS proteinů. Analýza aminokyselinových sekvencí naznačila shodný vzor $X_3-F-X_3-F-X_4-F$, kde X je pozitivně nabitá aminokyselina a F je hydrofobní aminokyselina.

Popsán byl další vzor 1-8-14 umožňující vazbu s kalmodulinem, který lze rozdělit na dva typy. Typ A, F-X₃-F-X₂-F-X₅-F, který je charakteristický pro calcineurin a dále typ B, F-X₆-F-X₅-F, který se objevuje u fordrinu (X je pozitivně nabitá aminokyselina a F je hydrofobní aminokyselina).

Spojovací helixový linker u kalmodulinu je dlouhý a flexibilní, což dovoluje globulárním doménám dosáhnout ideální pozice vůči cílovému proteinu včetně specifického BAA segmentu. U několika enzymů BAA helix byl zjištěn v blízkosti autoinhibiční domény, která překážela vazbě samotného kalmodulinu. Po navázání Ca²⁺ iontů na kalmodulin došlo ještě k většímu prostorovému uvolnění, včetně posunu na BAA helix a následně k aktivaci enzymu.

Apokalmodulin (ApoCaM) - kalmodulin bez navázaného Ca²⁺ nebo kalmodulin s částečně obsazenými místy pro Ca²⁺ ionty je schopen se vázat na místa cílových proteinů, ve kterých lze taktéž najít jisté charakteristické vzorce a motivy. Nejlépe známým je tzv. IQ motiv, který interaguje právě s ApoCaM (Rhoads and Friedberg 1997). Konkrétně s částí globulární domény v polootevřeném stavu na C terminálním konci (Swindells and Ikura). IQ motiv tvoří 5 až 11 volně seřazených aminokyselin. Různé IQ motivy interagují s CaM doménou při odlišných Ca²⁺ koncentracích dokonce i nezávisle na Ca²⁺ (Jurado, Chockalingam et al. 1999).

Afinita ApoCaM k Ca²⁺ iontům a cílovým proteinům může být také modulována. Při reakci tří složek Ca²⁺, CaM a peptidu P, má CaM s Ca²⁺ vyšší afinitu k P proteinu než ApoCaM, a naopak ApoCaM s navázaným P proteinem má vyšší afinitu k Ca²⁺ iontům než nenavázaný ApoCaM. Navázáním enzymu se může zvýšit afinita CaM k Ca²⁺ až 100x. (Jurado, Chockalingam et al. 1999). Používání běžných chelatačních činidel pro Ca²⁺ (EGTA nebo BAPTA) nemusí s jistotou vyvázat ionty z komplexu CaM s iontovým kanálem nebo enzymem.

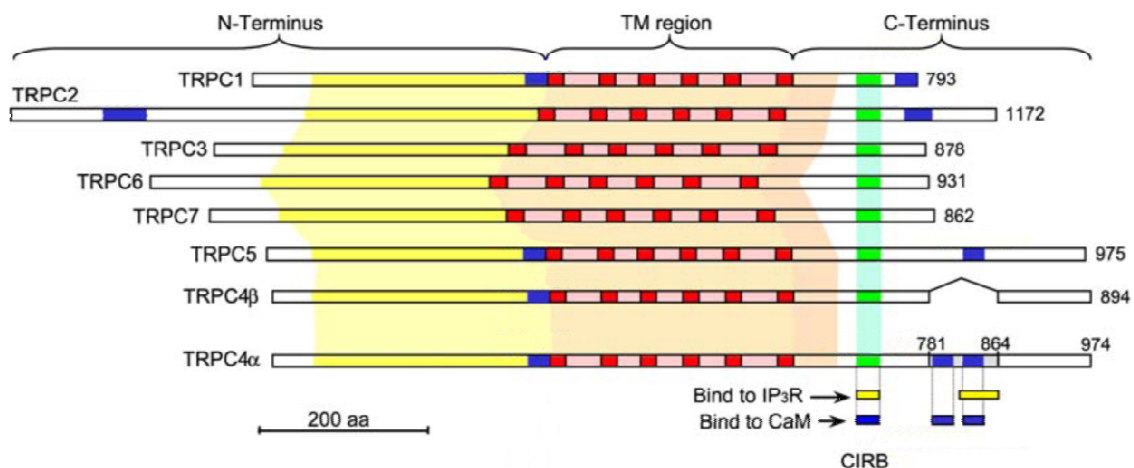
Vyskytovat se mohou i další vazebná místa než jen dvě hlavní hydrofobní oblasti CaM, které se shodují se sekvencemi vazebných motivů (1-5-10, 1-8-14, IQ atd.) cílových proteinů. Bylo zjištěno, že kalmodulin se umí současně vázat ke dvěma nesousedícím proteinům, γ -podjednotce fosforylázy a kinázy, do výsledného komplexu s extrémně silnou vazbou (Dasgupta, Honeycutt et al. 1989). U NO-synteázy typu II je potřeba navíc dodatečná sekvence k BAA segmentu, aby došlo k vazbě CaM bez Ca²⁺ iontů. Mutace v kalmodulinovém helixu I a III tvořící EF motiv, mají nepřiměřený

negativní efekt na aktivitu NO syntetázy, což nepřímo naznačuje na interakci této části kalmodulinu s enzymem (Su, Blazing et al. 1995). Molekula kalmodulinu kromě aktivační funkce pomáhá při dimerizaci glutamátdehydrogenázy. Kalmodulinové vazebné místo glutamátdekarboxylázy obsahuje 5 negativně nabitých aminokyselin. Jedna molekula kalmodulinu váže 2 taková místa a funguje jako dimerizační spojka (Yuan and Vogel 1998). Obě globulární domény kalmodulinu jsou na sobě nezávislé a mohou reagovat s různými cílovými partnery. Překvapující je dokonce interakce kalmodulinu s transkripčními faktory, čímž narušuje jejich vazbu na DNA a transkripční aktivaci (Onions, Hermann et al. 2000).

1.5.2 TRPC rodina a kalmodulin

Kalmodulin je řídicí jednotka pro mnoho proteinů, které jsou regulovány Ca^{2+} ionty, včetně iontových kanálů. TRPC receptory nevyjímaje. Poprvé byl použit kalmodulin jako expresní sonda při klonování TRPC1 a následně studie potvrdila interakci kalmodulinu s TRPC1 a postupně se všemi členy TRPC rodiny (Phillips, Bull et al. 1992; Chevesich, Kreuz et al. 1997). Kde k interakci dochází, pomohla objasnit série vazebných studií a poznání sekvenčních motivů umožňující vazbu kalmodulinu.

Za účelem získat další informace o receptorové regulaci řízené kalmodulinem, došlo k prozkoumání vazebných míst u savčích TRPC receptorů. Vazebnými experimenty byla ověřena přítomnost CIBR regionu na TRPC kanálech, který je schopen interagovat s CaM (Obr. 10) navíc metodou „*in silico*“ byla zjištěna další místa, která vyhovovala kalmodulinovým vazebným motivům (Rhoads and Friedberg 1997). Oblast zodpovědná za interakci s kalmodulinem je vymezena krátkým nepřerušovaným α -helixem. Většina identifikovaných míst byla ověřena i „*in vitro*“ vazebnými studiemi s krátkými izolovanými úseky daného receptoru (Zhu 2005).



Obr. 10.: TRPC rodina a její vazebná místa pro kalmodulin

Grafické znázornění vazebných míst pro inositol-1,4,5-trisfosfátový receptor (IP₃R) a kalmodulin (CaM) na TRPC kanálech. Naznačen je společný vazebný region pro IP₃R a CaM - CIBR (zelená barva), který se vyskytuje u všech členů TRPC rodiny. Další vazebná místa pro kalmodulin (modrá barva) se vyskytují střídavě na N a C terminálních koncích. Sekvence obsahuje také transmembránové segmenty (červená barva) a konzervované aminokyselinové úseky extracelulárních N konců (žluté stínování) a transmembránových úseků (červené stínování). Podskupina TRPC3/6/7 obsahuje pouze jediné CaM vazebné místo na C konci. TRPC4α má dokonce 4 CaM vazebná místa, z nichž 3 jsou na C terminálním konci, na rozdíl od zkrácené verze TRPC4β, která na C konci má lokalizovaný pouze CIBR region. (Zhu 2005)

Intenzivní studium specifických motivů u cílových proteinů (IQ, 1-5-10, 1-8-14,...) pomohlo vytvořit algoritmus pro *in silico* experimenty. Vznikla databáze cílových molekul pro kalmodulin, což zjednodušilo hledání potenciálních vazebných míst (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>). Stále je potřeba ověřit *in vitro* vazbu daného proteinu, neboť vyhovující α -helix nemusí být prostorově přístupný pro molekulu CaM.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavní náplní doktorské práce byla charakterizace interakcí mezi vybranými intracelulárními konci TRP kanálů s jejich vazebnými partnery. Shrnuje do několika následujících bodů.

- 1) Návrh a realizace fúzních konstruktů vybraných intracelulárních C konců TRP kanálů s využitím metod molekulární genetiky.
- 2) Exprese a purifikace mutantních verzí konstruktů připravených bodovou mutagenezí
- 3) Charakterizace interakce konstruktů TRPC6 a jeho mutantních verzí s Ca^{2+} vazebnými partnery S100A1 a kalmodulinem pomocí metod fluorescenční spektroskopie.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Konstrukce expresních plazmidů

Pro všechny TRPC6 konstrukty, které byly navrženy pro vazebné experimenty při charakterizaci a studiu interagujícího regionu na proteinu TRPC6 s kalmodulinem a S100A1, byl použit bakteriální expresní vektor pET42b (Novagen), který mimo jiné obsahuje resistenci na kanamycinové antibiotikum.

Na nukleotidové sekvenci vybraného konstruktu TRPC6-CT 801-878 bylo pomocí syntetizovaných primerů připraveno reakční místo pro restrikční endonukleázy NdeI a XhoI. Restrikční endonukleázy pro vektor pET42b byly vybrány tak, aby purifikace fúzního proteinu byla díky přítomnosti histidinových regionů co jednodušší. Nakonec byl vybrán pouze jeden histidinový region a protein byl exprimován pouze se samostatnou histidinovou kotvou (6xHisTag). Ostatní kotvy (6xHisTag, GST) byly eliminovány tím, že jejich DNA sekvence byly vyštípnuty vybranými endonukleázami. Amplifikace proběhla metodou PCR. Zvolený program měl nastavené parametry pro reakční cyklus (1min - 95°C; 1min - 55°C; 1 min. 72°C; celkem 25 cyklů). Směs byla přečištěna a PCR produkt štěpen příslušnými restrikčními enzymy NdeI a XhoI podle protokolu. Takto upravený konstrukt byl zaligován pomocí ligázy dle protokolu do prázdného vektoru pET42b naštěpeného opět endonukleázami NdeI a XhoI. Připravený vektor byl transformován teplotním šokem do bakteriálního systému Top10 s rezistencí na streptomycin a nově na kanamycin, kterou poskytuje vektor pET42b. Baktérie byly rozetřeny na misky s agarem obsahující kanamycinové antibiotikum. Po 24h inkubaci při 37°C byly vybrány kolonie, které byly následně namnoženy ve 2ml LB média s požadovanou koncentrací příslušných antibiotik. Izolovaná DNA byla vizualizována na 1% agarózovém gelu s hmotnostním žebříkem a úspěšná inkorporace vektoru byla ověřena metodou sekvenace DNA (ABI PRISM 3130xl DNA Sekvenator).

3.2 Konstrukce mutantních verzí konstruktů TRPC6

Metodou cílené bodové mutace byl získán soubor mutantních forem, které se lišily od původního konstruktů jednou, dvěma nebo třemi aminokyselinami. Záměna

původní aminokyseliny v sekvenci za alanin byla dosažena změnou báze v DNA úseku kódujícím translační triplet pro danou aminokyselinu. Syntetické oligonukleotidy dlouhé 36-42 bází byly připraveny s požadavkem na zvýšené procento C-G párů, kvůli silnější vazbě mezi primerem a templátovým řetězcem DNA.

V laboratoři bylo využito pracovního kitu Quick ChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Do reakční směsi byla použita DNA polymeráza *PfuUltraTM High Fidelity* (Stratagene) pro vysokou bezchybnost při přepisu DNA. Během metody cílené bodové mutace byl dodržován protokol stanovený výrobcem.

5,0 µl Pfu Ultra pufru 10x

1,5 µl 10mM dNTP

1,0 µl templátové DNA (10ng/µl)

1,0 µl „upstream“ oligonukleotidu (0,3nM/µl)

1,0 µl „downstream“ oligonukleotidu (0,3nM/µl)

1,0 µl Pfu UltraTM High Fidelity polymerázy

39,5 µl demineralizované vody

Celkový objem reakce byl 50 µl

PCR program:

Denaturace DNA - 95°C – 1 min.

Vazba oligonukleotidu na denaturovaný DNA řetězec - 45-55°C – 1 min

Polymerace DNA řetězce - 68°C – 12 min

25x cyklů

Dokončení polymerace DNA řetězce - 68°C – 10 min

Takto získaný PCR produkt byl vystaven působení restriční endonukleázy DpnI, která přednostně štěpí metylovanou templátovou DNA. Inkubace vzorku byla po dobu 1 hodiny při 37°C. Pro ověření přítomnosti žádané mutace byl produkt transformován teplotním šokem opět do bakteriálního systému buněk Top10 (resistence Kan, StrM). Po 24h inkubaci na agarových miskách při 37°C byly vybrány kolonie, kterým byla osekvenována izolovaná DNA (ABI PRISM 3130xl DNA Sekvenator).

3.3 Exprese a purifikace konstruktů TRPC6 (801 – 878)

TRPC6 konstrukt obsahující část C konce, konkrétně Asn 801 – Val 878, byl navržen pro bakteriální expresní vektor pET42b. Pro zlepšení purifikace proteinu od bakteriálního balastu byl exprimován jako fúzní protein s histidinovou kotvou. K produkci byl použit bakteriální systém E. Coli Rosetta. Baktérie byly kultivovány v 1dm³ média podle Luria a Bertaniho (LB-médium) za přítomnosti kanamycinového a chloramfenikolové antibiotika (koncentrace kanamycinu 50 µg/ml, koncentrace chloramfenikolu 34 µg/ml) při 37°C. Narůstající optická denzita média byla kontrolována na hodnotu O.D. = 0,5, kdy byla teplota snížena na 25°C a po dalším zvýšení O.D. nad hodnotu O.D. = 0,8 měřeno při 600nm, byla kultura indukována 1ml roztoku isoprophyl-1-thio-β-D-galaktopyranosidu (IPTG) o celkové koncentraci 0,5mM a kultivována při teplotě 20°C po dobu 16 hodin za stálého míchání 220rpm v třepačce.

Po uběhlé době bylo s kultivačním médiem manipulováno na ledu (teplota 0°C), Médium bylo centrifugováno při 1000g po dobu 15 minut v předchlazené centrifuze na 4 °C (Centrifuga Beckman). Bakteriální pelet byl resuspendován v lyzačním pufru (1x PBS; pH 7,5; 700mM NaCl, 4mM β-ME, 0,2mM PMSF, 10mM Imidazolu) a nechán inkubovat s 500µl lysozymu (25mg/ml) 30 minut na ledu. Homogenát byl následně sonikován ultrazvukovou jehlou na ledu (celkem 20 minut), aby došlo ke kompletnímu rozbití buněčných membrán. Surový extrakt byl centrifugován při 20000g dobu 45 minut v předchlazené centrifuze na 4°C. Získaný supernatant obsahoval fúzní exprimovaný TRPC6 CT (801-878) s histidinovou kotvou pro lepší purifikaci od ostatních proteinů.

Pro získání čistého proteinu TRPC6 CT (801-878) byly použity separační metody, založené na afinitní chromatografii. Chelatační sefaraža chromatografické kolony má schopnost po aktivaci Ni²⁺ ionty vázat přednostně právě histidinovou kotvu. Všechny navržené konstrukty proteinů byly produkovány s HisTag kotvou pro purifikaci na koloně naplněné chelatační sefaražou – FastFlow (Amersham Bioscience GE Healthcare Life Science). Při purifikaci bylo postupováno dle standardního protokolu. Supernatant byl nanesen na kolonu obsahující 5ml chelatační sefaražy, která

byla ekvilibrována pufrům s Ni^{2+} ionty. Proteiny vázající se nespecifickou vazbou byly odstraněny z kolony dvojstupňovým promytím pufrů obsahující 20mM, respektive 80mM imidazol.

Navázaný protein TRPC6 CT (801-878) s histidinovou kotvou byl eluován pufrům obsahující 250mM imidazol. Jímané frakce s čistým proteinem byly spojeny a dialyzovány proti 1dm³ pufru 20mM TRIS, 500mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,5 při 4°C.

Před gelovou permeační chromatografií byl fúzní TRPC6 CT (801-878) zakoncentrován membránovým koncentrátorem Centriprep column (Amicon Millipore – MWCO 3kDa).

Gelovou permeační chromatografií koloně Superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech) byl protein převeden do pufru 25mM TRIS, 500mM NaCl 2mM, CaCl₂, pH 7,5. Homogenita a čistota proteinu TRPC6 CT (801-878) v jednotlivých frakcích byla ověřena SDS-PAGE elektroforézou. Vzorek byl charakterizován hmotnostní spektrometrií (viz kapitola 3.7.). Koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky metodou kvantifikace proteinů bicinchoninovou kyselinou (BCA).

3.4 Exprese a purifikace S100A1 pro vazebné experimenty

Expresní vektor pET28b s komplementární DNA kódující sekvenci pro S100A1 byl transformován do bakteriálního kmenu E.Coli BL21 (DE3). Vektor pET28b obsahuje ve své sekvenci kanamycinovou rezistenci.

Buňky byly kultivovány v 1dm³ LB média s kanamycinovým antibiotikem při 37°C (finální koncentrace kanamycinu 50 µg/ml). Jakmile buněčná kultura měřená při 600nm dosáhla optické denzity O.D. = 0,6, byla ochlazená na laboratorní teplotu a zaindukována 1ml roztoku 0,5mM IPTG a nadále kultivována při teplotě 25°C po dobu 12 hodin. Poté bylo médium přemístěno na led (0°C) a v předchlazené centrifuzě na 4°C (Beckman Coulter) centrifugováno na 1000g po dobu 15 min. Peleta bakterií byla resuspendována v pufru 50mM TRIS, pH 7,5, 100mM NaCl, 0,2mM PMSF. Rozptýlené buňky v pufru byly mechanicky rozrušeny sonikací na ledu po dobu 10 minut celkového ultrazvukového působení (10s ultrazvukový impuls v 20s intervalech). Nerozrušená a

nerozpustná frakce sonikátu byla odstraněna centrifugací 45 minut při 20000g a teplotě 4°C (Beckman Coulter).

Pro získání čistého a funkčního proteinu S100A1 byl použit modifikovaný protokol založený na bázi afinitní chromatografie, který byl v laboratoři používán pro purifikaci vápník vázajícího proteinu kalmodulinu (CaM). K supernatantu byl přidán roztok CaCl₂ do finální koncentrace 5mM.

Purifikace aktivního proteinu S100A1 ze sonikátu proběhla pomocí chelatační fenyl-sefarózy CL-4B (Amersham Biosciences GE Healthcare Life Science) ekvilibrované v pufru 50mM TRIS, pH 7,5 100mM NaCl, 2mM CaCl₂. Nenavázaný proteinový balast byl odmyt objemem 200ml ekvilibračního pufru s vysokou koncentrací soli 500mM NaCl a 5mM CaCl₂. Navázaný S100A1 byl vytěsněn z kolony elučním pufrům 50mM TRIS, pH 7,5, 100mM NaCl, obsahujícím 1,5mM EGTA. Protein byl zakoncentrován ultrafiltrací přes membránový koncentrátor Centriprep column (Amicon Millipore – MWCO 3 - kDa).

Finálním separačním krokem byla zvolena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 75HR 10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech). Zakoncentrovaný fúzní protein byl na ekvilibrované koloně převeden permeační chromatografií do pufru 25mM TRIS, pH 7,5, 100mM NaCl, 2mM CaCl₂. Čistota a přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla kontrolována na vertikální polyakrylamidové SDS elektroforéze. Ověřené frakce s vypurifikovaným proteinem S100A1 byly spojeny a zakoncentrovány opět ultrafiltrací přes membránový koncentrátor. Koncentrace S100A1 byla stanovena pomocí BCA metody spektrofotometricky při 562nm po inkubaci s kyselinou bicinchoninovou.

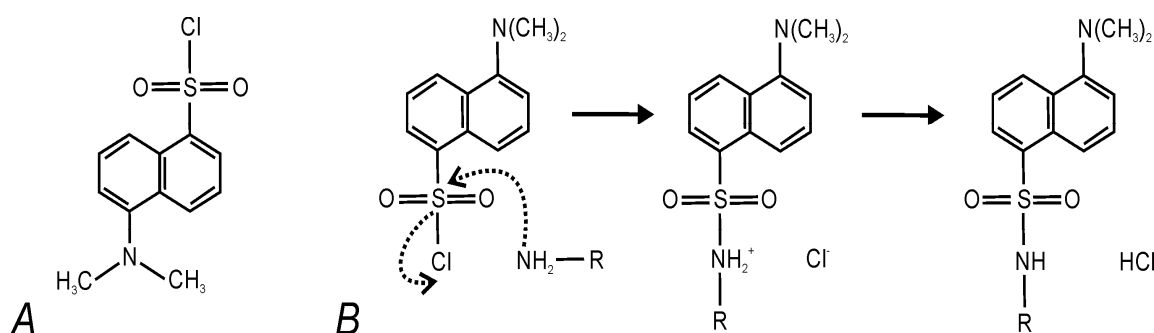
3.5 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie je metoda založena na pozorování fluorescence, to jest na schopnosti některých látek emitovat energii formou sekundárního záření v krátké časové době (10^{-9} s – 10^{-6} s). Emitované záření je vyzářeno excitovaným atomem při zpětném přechodu do základního stavu. Fluorescence byla pozorována u organických látek s aromatickými cykly. Ty jsou využívány jako fluorescenční sondy při studiu

biomolekul (proteinů, peptidů, ligandů, oligonukleotidů a jiných), na které jsou umístěny kovalentní vazbou. Nevlastní fluorofory jsou navázány na aminové, sulfhydrylové, histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd. tak, aby nedošlo k ovlivnění studovaného místa nebo aktivity biomolekuly.

3.5.1 Fluorescenční sonda – Dansylchlorid

Mezi nejrozšířenější a často používané fluorofory patří dansylchlorid (DNSC) (obr. 11A). Tato fluorescenční značka reaguje v mírně alkalickém prostředí s volnými aminoskupinami proteinů za několikanásobného nadbytku činidla. Dansylchlorid reaguje s aminokyselinami podle schématu (obr. 11B) za vzniku příslušných sulfoamidů s absorpčním maximem při 298nm.

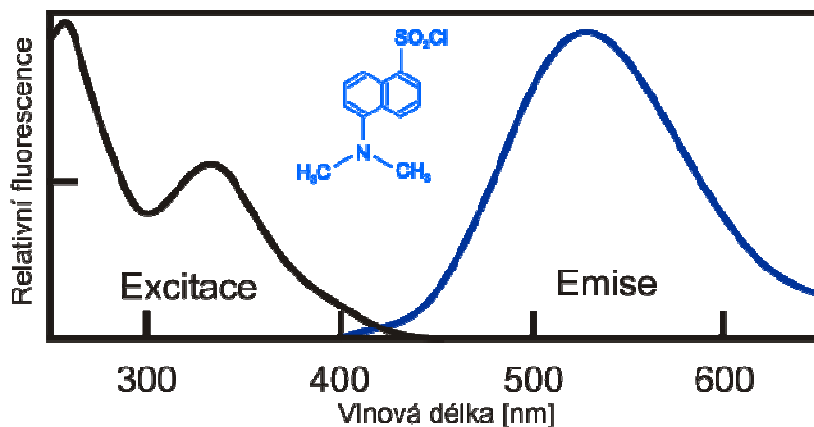


Obr.11.:Fluorescenční sonda

A) Dansylchlorid (5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonyl chlorid)

B) Dansylchlorid (DNSC, 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonyl chlorid) je sonda vázající se dle reakčních podmínek na primární, sekundární (terciární) volné aminové skupiny proteinu (R) za vzniku stabilních derivátů schopných fluorescence.

DNSC je často používán pro značení proteinů, díky excitační vlnové délce 340 - 380nm, při které je záření absorbováno pouze DNSC skupinou a ne bílkovinou. Fluorescenční emisní spektrum dansylové skupiny vykazuje maximum v rozmezí 470 - 520nm (obr. 12).



Obr.12.: Excitační a emisní spektra pro fluorescenční sondu dansylchlorid

Excitační spektrum fluoroforu je v rozmezí 340-380nm, ve kterém dochází k absorpci energie pouze sondou. Emisní spektrum má výrazné maximum v rozpětí 470-520nm.

3.5.2 Značení fúzního proteinu S100A1 dansylchloridem

Protein S100A1 byl naznačen fluorescenční sondou DNSC. Prvním krokem byl dialýzou (8 hodin při 4°C) převeden S100A1 do reakčního pufru 10mM NaHCO₃, pH 10,0, 100mM NaCl. Po dialýze byl připipetován roztok 0,06mM dansylchloridu (Sigma Aldrich) rozpuštěný v acetonu za stálého míchání po kapkách, v molárním poměru 1:1,5 (protein:DNSC). Reakce probíhala ve tmě 12 hodin za stálého míchání při 4°C. Nenavázaná sonda DNSC byla odstraněna dialýzou proti 100 násobnému objemu pufru 25mM TRIS, pH 7,5, 150mM NaCl, 2mM EDTA a finální dialýzou byl naznačený S100A1 převeden do pufru TRIS, pH 7,5, 150mM NaCl, 2mM CaCl₂. Dialýzy probíhaly 8 hodin při 4°C. Stechiometrický poměr inkorporace dansylchloridu na protein S100A1 byl vypočten porovnáním spektrofotometrického měření absorbancí při 280nm a 340nm s extinčním koeficientem 4300m⁻¹ cm⁻¹ pro S100A1 značeným DNSC.

3.5.3 Anizotropie fluorescence

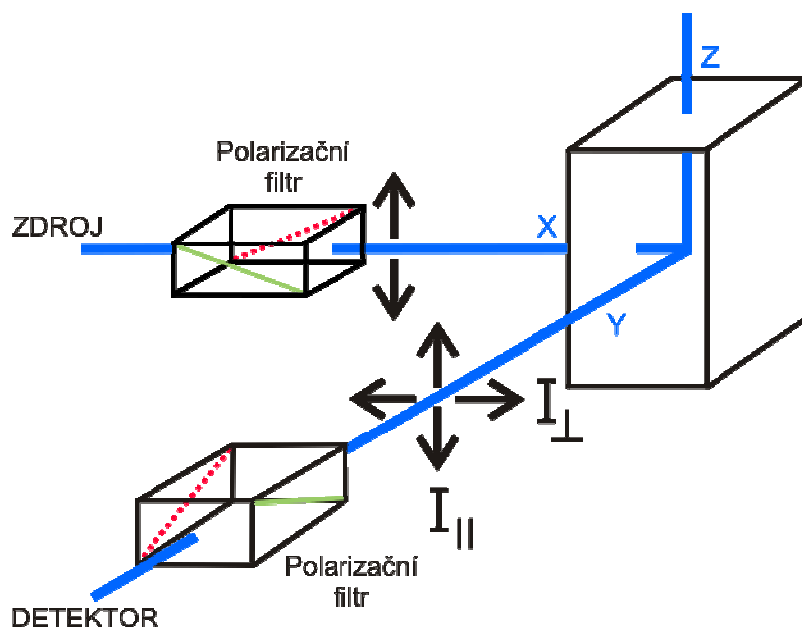
Měření anizotropie fluorescence je metoda biochemického výzkumu využívající schopnost luminiscence, což je jev vyskytující se u chemických sloučenin, které po absorpci záření jsou schopny excitovat své elektrony do vyšších energetických hladin, odkud se postupně jedním nebo více spontánními přechody vrací do základního energetického stavu. Tyto přechody jsou doprovázeny emisním zářením. Podle doby

trvání těchto přechodů (neboli dohasínání) se luminiscence rozděluje na fosforescenci (déle jak 10^{-8} s) a fluorescenci (řádově 10^{-8} s). Látky schopné fluorescence se nazývají fluorofory, jsou to většinou malé organické látky obsahující aromatická jádra (např. DNSC) nebo rovnou celý protein (GFP – green fluorescent protein).

Měření lineárně polarizované fluorescence (Obr. 13) je založeno na jevu zvaném fotoselekce. Při excitaci fluoroforů lineárně polarizovaným zářením, dochází k fotoselektivnímu excitování těch molekul fluoroforů, které mají vektor absorpčního přechodového momentu orientován s rovinou k elektrickému vektoru excitačního záření. Excitovat se mohou všechny molekuly s nenulovým průmětem absorpčního momentu do směru polarizace. Molekula fluoroforu je během fluorescence v pohybu, převážně v rotačním, tím dojde k situaci, kdy emitované záření není shodné s absorbovaným, ale je potočené o určitý úhel, a tak následně dochází k depolarizaci. Rotační pohyb fluoroforu je jeden z obvyklých příčin depolarizace.

Anizotropie fluorescence (r) se používá pro vyjádření míry polarizace fluorescence založené na fotoselektivní excitaci fluoroforů polarizovaným světlem v opticky izotropním vzorku (Valeur 2001). Anizotropie fluorescence je závislá na rychlosti rotace molekul, která je popsána rotačním korelačním časem (čas, za který se molekula otočí o jeden radián). Odchylka úhlu je závislá na rozsahu rotačního pohybu během trvání excitovaného stavu. Tahle rotační difúze závisí na viskózním odporu, který je způsobený typem roztoku a hlavně tvarem a velikostí rotujících molekul. Výsledkem změny viskozity nebo velikosti molekuly fluoroforu bude změna anizotropie fluorescence. Pro malé fluorofory v roztocích o nízké viskozitě je míra rotační difúze rychlejší než čas emise, ta je depolarizována a anizotropie fluorescence se blíží nule. V případě vzniku komplexu fluoroforu s vazebným partnerem dochází ke zvětšení velikosti molekuly, v tomto případě komplexu a anizotropie fluorescence bude nenulová.

Měření anizotropie fluorescence se používá k určení denaturace proteinu, interakce proteinu s dalšími molekulami a také k vnitřním dynamickým procesům uvnitř biomolekul. Kromě toho pomocí anizotropie fluoroforu navázaného na membránu se dá zjistit vnitřní viskozita membrány a efekty jejího lipidového složení (Valeur 2001).



Obr.13.: Uspořádání měření anizotropie fluorescence

Vzorek je excitován procházejícím vertikálně polarizovaným světlem, jehož elektrický vektor je orientován paralelně k vertikální ose z . Detektorem je měřena intenzita emisního záření procházející polarizačním filtrem. Pokud je emise polarizovaného světla orientována paralelně ke směru polarizace excitace, pak sledujeme paralelní intenzitu ($I_{||}$). Pokud je polarizátor nastaven na kolmý směr k polarizaci excitačního záření, intenzita se nazývá kolmá (I_{\perp}). Z těchto hodnot lze matematickým vztahem určit anizotropii fluorescence (r) vzorku (Lakowicz 1999).

Měření anizotropie za ustáleného stavu pomocí fluorescence bylo zvoleno jako metoda k určení disociační konstanty mezi fluoroforem značeným S100A1 fúzním proteinem a TRPC6 CT (801-878). Experiment probíhal za laboratorní teploty v křemenné kyvetě o tloušťce 1cm na spektrofluorimetru ISS PC1TMPhoton-Counting. Excitační a emisní monochromátor byl nastaven na 340nm, respektive 520nm pro všechna měření vzorků. Byla naměřena data pro TRPC6 CT (801-878) protein a jeho mutantní formy v přítomnosti S100A1 proteinu označeného fluorescenční sondou DNSC. Anizotropie (r) je definována matematicky vztahem (Rov.1.):

$$\text{—————} \quad (\text{Rov.1.})$$

kde I_P je intenzita emisního záření procházející polarizátorem v paralelním uspořádání ke směru polarizace excitačního záření. I_K je intenzita emisního záření procházející polarizátorem v kolmém uspořádání ke směru polarizace excitačního záření (Obr.13).

3.5.4 Stanovení disociační konstanty

Navázaná frakce TRPC6 CT (801-878) (F_B) byla vypočtena dle rovnice (Rov.2.):

$$F_B = \frac{(r_{obs} - r_{min})}{(r_{max} - r_{obs})Q + (r_{obs} - r_{min})} \quad (\text{Rov.2.})$$

kde r_{obs} je změřená anizotropie pro danou koncentraci TRPC6 CT (801-878) proteinu, r_{max} anizotropie saturovaného DNSC – S100A1 a r_{min} minimální naměřená anizotropie pro volný S100A1 značený DNSC. Parametr Q představuje poměr kvantových výtěžků navázané a volné formy fluoroforu (Lakowicz 1999) .

Rovnovážná disociační konstantu (K_D) byla získána proložením naměřených hodnot F_B navázané frakce TRPC6 CT (801-878) v závislosti na koncentraci proteinu TRPC6 CT (801-878) matematickou funkcí dle vztahu (Rov.3.):

$$F_B = \frac{K_D + [P_1] + [P_2] - \sqrt{(K_D + [P_1] + [P_2])^2 - 4 [P_1][P_2]}}{2 [P_1]} \quad (\text{Rov.3.})$$

kde K_D je rovnovážná disociační konstantu (K_D), $[P_1]$ je koncentrace značeného S100A1 sondou DNSC a $[P_2]$ koncentrace TRPC6 CT (801-878) (Kohler and Schepartz 2001). Nelineární proložení bylo provedeno programem SigmaPlot10.

3.6 CD spektroskopie

Metodou cirkulárního dichroismu bylo stanoveno poměrné zastoupení konformací s různou sekundární strukturou proteinu. Měření spekter bylo provedeno na spektropolarimetru Jasco J-815 (Tokio, Japonsko) v rozsahu od 200 do 300nm,

skenovací rychlostí 20nm za minutu s krokovým rozlišením 0,5nm, šířkou štěrby 1nm a reakčním časem 8s. Byla použita standardní křemenná kyveta o tloušťce 0,1 cm pro všechny experimenty, které probíhaly za laboratorní teploty. Výsledná naměřená data byla vyjádřena v podobě závislosti veličiny Q – molární elipticity [$\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$] na vlnové délce [nm]. TRPC6 CT (801-878) a S100A1 ve formě fúzních proteinů byly proměřeny samostatně a následně v komplexu v molárním poměru 1:1. Koncentrace proteinů byla 340 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v pufru 25mM TRIS, 500mM NaCl, 2mM CaCl_2 , pH 7,5. K určení zastoupení konformací sekundární struktury bylo využito online dostupného programu Dichroweb software pro analýzu dat z měření cirkulárního dichroismu (Whitmore and Wallace 2008).

3.7 Hmotnostní spektrometrie

Aminokyselinová sekvence vypurifikovaného proteinu TRPC6 CT (801-878) byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie. Část odbarveného gelu SDS-PAGE, která obsahovala vypurifikovaný protein, byla modifikována jodoacetamidem a podrobena endoproteázovému štěpení trypsinem (Promega). Získaná směs peptidů byla nanášena na terčík s matrix α -cyano-4-hydroxycinnamovou kyselinou. Po této přípravě vzorku byla naměřena hmotnostní spektra MS/MS pozitivně nabitých iontů metodou MALDI-TOF na hmotnostním spektrometru UltraFLEX III s vnitřní kalibrací (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). Zjištěné monoisotopické $[M+H]^+$ ionty byly porovnány s databází trypsinových produktů štěpení TRPC6 CT (801-878) a následně přiřazena aminokyselinová sekvence.

3.8 EMSA

Schopnost vazby rekombinantního fragmentu TRPC6 CT (801-878) k CaM byla ověřena pomocí metody EMSA, neboli změny elektroforetické pohyblivosti v nativním polyakrylamidovém gelu. CaM v množství 0,3nmol byl titrován zvyšujícím se přídatkem TRPC6 CT (801-878) v určených násobcích 0,5x, 1x, 2x, 4x molárního poměru k CaM za přítomnosti 1mM CaCl_2 . Druhá série experimentu proběhla ve

stejném pufru, avšak bez přítomnosti CaCl_2 . Nativní PAGE probíhala na ledu v elektroforetickém pufru o pH 8,3, ve druhém případě bylo v elektroforetickém pufru přítomno navíc ještě chelatační činidlo EGTA o 0,5mM koncentraci namísto CaCl_2 .

3.9 Homologní modelování struktury komplexu

Na základě homologie byl vytvořen model TRPC6 CT pomocí programu Modeller 9v2 (Sali and Blundell 1993). Většina CaM vazebných domén zaujímá strukturu α -helixu, proto bylo předpokládáno, že C terminální konec TRPC6 nebude výjimkou a bude vykazovat taktéž α -helixovou strukturu ve vazebné oblasti.

Jako templát pro modelování CaM vazebné domény byla použita vykryštalizovaná struktura draselného kanálu RSK2 (pdb 1G4Y) (Caterina, Schumacher et al. 1997) a peptid interagující s CaM z lidské „death-associated“ proteinkinasy 2 (pdb 1WRZ) (Zhang, Majava et al. 2009). Předlohou pro C terminální konec TRPC6 byla použita přiřazená sekvence programem ClustalX1.81 ze savčího fragmentu TRPC6, konkrétně v délce 21 aminokyselin (851-872) (Thompson, Higgins et al. 1994). Komplex vazebného místa CaM-TRPC6 CT byl vytvořen a energeticky minimalizován s využitím programu Swiss-PdbViewer (GROMOS96 forcefield). Ověření a dokončení modelu proběhlo v programu CootToolKit (Emsley and Cowtan 2004). K vizualizaci proteinového modelu byl použit program PyMol 0.99rc6 (DeLanoScientific 2006).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 VÝSLEDKY

Pro detailnější charakterizaci a studium vazebného místa, které je schopno interagovat s CaM a S100A1 jsme potřebovali získat rozpustnou formu fúzního proteinu obsahující určenou oblast. V predikovaném úseku (Obr.14) pro CaM vazebný motiv jsme se zaměřili na hydrofobní a bazické aminokyselinové zbytky, které byly nahrazeny pomocí metody bodové mutace za alanin, který je aminokyselinou bez postranního retězce.

```
Asn
801 NKNREEKKFG ISGSHE↓DL↓SK FSLDKNQLAH NKQSSTRSSE 840
841 DYHLNSFSNP PRQYQKIMKR LIKRYVLQAQ IDKESDEV 878
Val
```

Obr.14.: Aminokyselinová sekvence TRPC6 CT (801-878)

Přeložená DNA sekvence do jednopísmenného aminokyselinového kódu. Červeně vyznačené jsou bazické aminokyseliny, které byly vybrány a pozměněny bodovou mutací. Konstrukty R852, K856, R860, K859, R864 a jejich kombinace byly exprimovány, aby se prověřil vliv těchto aminokyselin na vazbu k CaM respektive ke S100A1.

Připraveny byly následující fragmenty TRPC6 CT (801-878): Arg852, Lys856, Ile857, Arg864, dvojmutantní verze Lys859/Arg860, trojmutantní verze Arg852/Lys859/Arg860, Lys859/Arg860/Arg864. Vazebnými experimenty byla zjištěna míra vlivu na interakci izolovaného fúzního fragmentu TRPC6 CT (801-878) s CaM respektive S100A1.

4.1.1 Příprava fúzního proteinu TRPC6 CT

Z pracovních DNA úseků o různých délkách byl vybrán TRPC6 CT (801-878), který se nám podařilo úspěšně produkovat v bakteriálním systému E.Coli BL21. V expresním vektoru pET42b byla použita histidinová kotva (6xHIS), která

zjednodušila purifikaci izolovaných proteinových konstruktů TRPC6 CT (801-878) včetně mutantních forem. Všechny exprimované konstrukty byly rozpustné a byly vypurifikovány v dostatečném množství pro měření spektroskopických vazebných experimentů.

Hmotnostní spektrometrií peptidových zbytků po trypsinovém štěpení byla zjištěna aminokyselinová sekvence připraveného konstruktů, která odpovídala 98% pokrytí sekvence.

Odštěpení histidinové kotvy trombinem, provázela silná agregace produktu, proto všechna měření probíhala na celém fúzním proteinu za přítomnosti histidinové kotvy.

4.1.2 Cirkulární dichroismus

Sekundární struktura exprimovaných proteinů byla ověřena měřením cirkulárního dichroismu. Matematickou analýzou spekter bylo získáno procentuální zastoupení možných sekundárních struktur, které shrnuje tabulka (Tab.2). U CaM a S100A1 je patrné velké zastoupení α -helixové konformace (64%, respektive 66%), což se shoduje se strukturou v jejich nativním stavu.

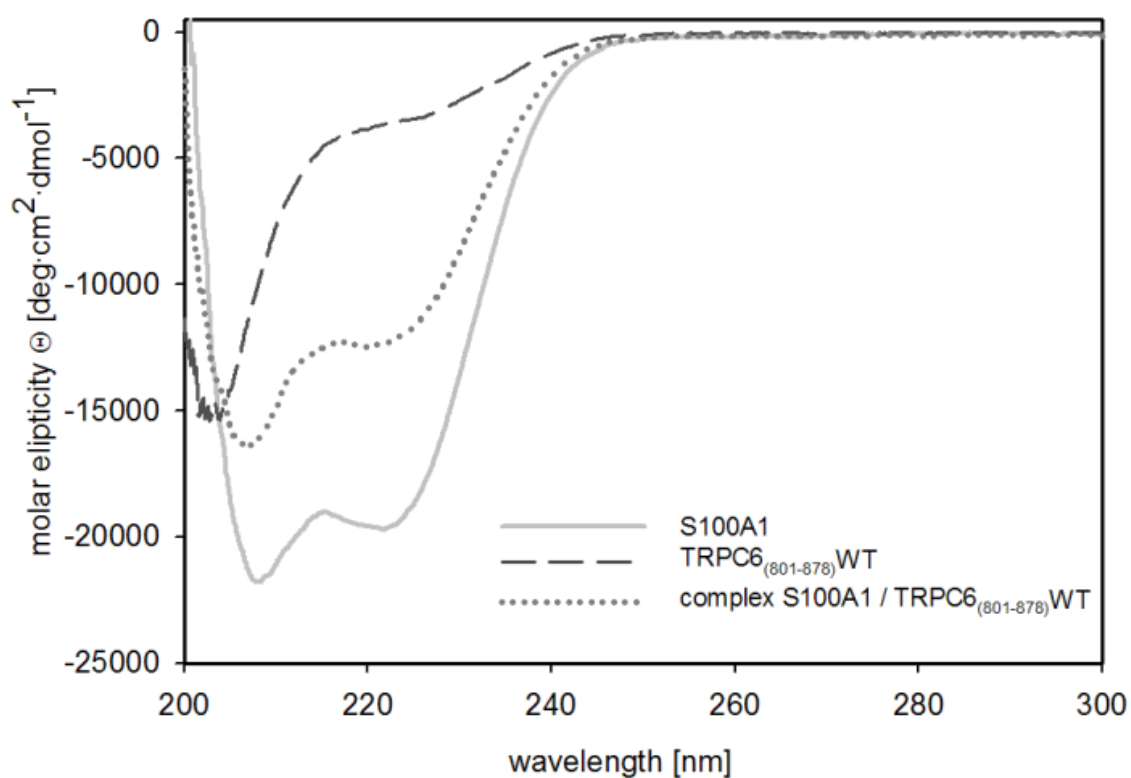
	α -Helix	Antiparalelní	Paralelní	β -Turn	Random Coil
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ WT	0,18	0,15	0,12	0,20	0,36
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ R852A	0,22	0,14	0,11	0,20	0,34
CaM	0,64	0,04	0,04	0,13	0,16
S100A1	0,66	0,03	0,03	0,12	0,15
S100A1 + TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ WT	0,43	0,07	0,07	0,17	0,25

Tab.2.: Zastoupení sekundární struktur měřených proteinů

Analýzou naměřených dat cirkulárního dichroismu bylo zjištěno zastoupení sekundárních struktur proteinů (vyjádřeno v procentech). CaM a S100A1 obsahují převážně α -helikální struktury, což je v souladu s jejich nativním stavem, naproti tomu TRPC6 CT (801-878) konstrukty, které obsahují α -helixů méně zaujímají neuspořádanou strukturu.

Data u fúzního proteinu TRPC6 CT (801-878) popř. mutantních verzí potvrzují přítomnost α -helixové struktury predikovanou na základě analýzy primární sekvence. C terminální fragment TRPC6 v porovnání s CaM nebo S100A1 zaujímá většinou neuspořádanou strukturu, což naznačuje možnost poskládání do nativní formy.

Spektra cirkulárního dichroismu byla naměřena pro vytvořený komplex fúzního proteinu TRPC6 CT (801-878) s S100A1 respektive CaM. Sledována byla změna v sekundární struktuře jako možný prvek při tvorbě komplexu. Výsledná data zobrazená v grafu (Graf.1) naznačila, že vznik komplexu TRPC6 CT (801-878) s kalmodulinem nebo S100A1 nemá podstatný vliv na sekundární strukturu TRPC6 CT, neboť spektrum komplexu odpovídá součtu jednotlivých spekter změřené pro proteiny samostatně.

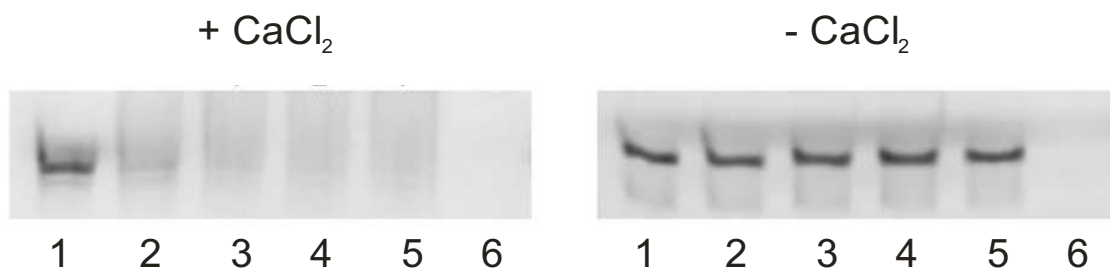


Graf.1.: Spektrum cirkulárního dichroismu pro S100A1 a TRPC6CT(801-878)

Závislosti molární elipticity na vlnové délce jsou znázorněny ve společném grafu pro TRPC6 CT (801-878), S100A1 a jejich komplex. Charakteristické dvojité minimum 208nm a 222nm ukazuje vysoké zastoupení α -helixu u S100A1.

4.1.3 EMSA

Závislost vazby rekombinantního fragmentu TRPC6 CT (801-878) k CaM na přítomnosti Ca^{2+} byla ověřena metodou změny elektroforetické pohyblivosti v nativním polyakrylamidovém gelu (EMSA). Ke kalmodulinu o celkovém množství 0,3nmol byl postupně přidáván TRPC6 CT (801-878) v 0; 0,5x; 1x; 2x; 4x násobek molárního množství. Experiment probíhal ve dvou reakčních pufrech. Prvním pufr obsahoval ionty CaCl_2 a ve druhém pufru bylo přítomno chelatační činidlo EGTA (Obr.15). CaM měl záporný náboj (pI 4,1) v nativním elektroforetickém pufru (pH 8,3). TRPC6 CT (801-878) v tomto pufru zůstal nabit kladně (teoretické pI 9,3), čímž bylo dosaženo opačných směrů pohybu biomolekul při působení elektrického proudu. CaM se pohyboval směrem do gelu, kde byl poté vizualizován obarvením Brilliant Blue G (Obr.14).



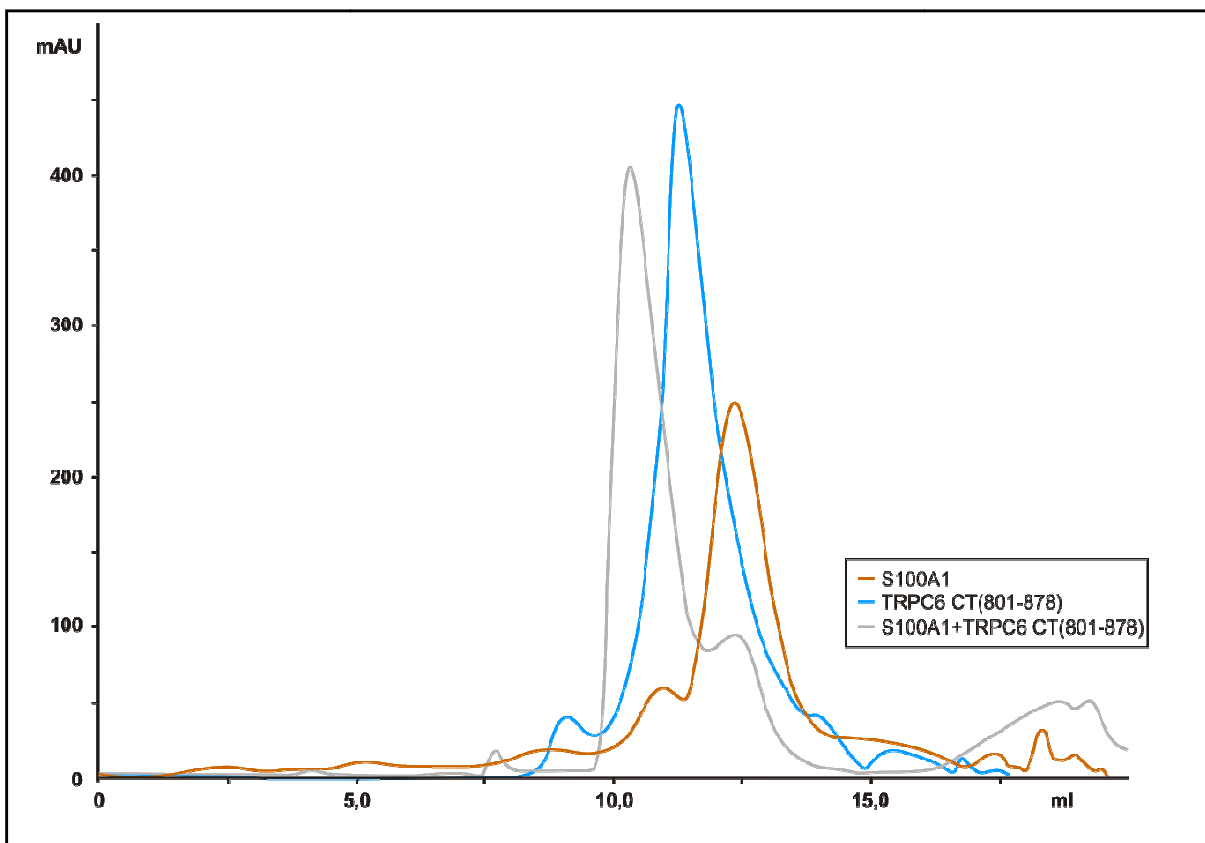
Obr.15.: Nativní PAGE CaM titrovaný TRPC6 CT (801-878)

Elektroforetický pufr o pH 8,3 způsobil opačné pohyby CaM (pI 4,1) a TRPC6 CT (801-878) (pI 9,3) při působení elektrického pole. Nativní PAGE probíhala ve dvou podmínkách, nejprve v přítomnosti CaCl_2 (+ CaCl_2) a poté za přítomnosti chelatačního činidla EGTA (- CaCl_2). CaM (dráhy 1-5) byl titrován postupně 0; 0,5x; 1x; 2x; 4x molárním násobkem TRPC6 CT. Pohyb samotného CaM směřoval do gelu, kde byl následně identifikován (dráha 1). Titrace potvrdila vznik komplexu CaM a TRPC6 CT (801-878) v přítomnosti Ca^{2+} iontů, neboť ve drahách 2-5 CaM do gelu nepronikl, respektive v dráze 2 pronikl molární přebytek CaM, který neměl již molekuly TRPC6 CT (801-878) k interakci. V reakčních podmínkách pozitivně nabitý TRPC6 CT (801-878) o pI 9,3 se do gelu vůbec nedostal, jak potvrdila kontrola v dráze 6. Odstraněním Ca^{2+} iontů chelatačním činidlem EGTA (- CaCl_2) komplex CaM a TRPC6 CT (801-878) nevznikl a CaM byl přítomen v gelu v drahách 2-5 bez viditelné změny koncentrace.

Kontrolní vzorek samotného CaM se pohyboval směrem do gelu (dráha 1), na rozdíl od vzorku TRPC6 CT (801-878) (dráha 6). Titrace postupným zvyšováním molárního násobku TRPC6 CT (801-878) potvrdila předpokládané jedno vazebné místo na konstruktu TRPC6 CT (801-878), které interaguje ve stechiometrickém poměru 1:1 a CaM v závislosti na Ca^{2+} , neboť v drahách 2-5 CaM v přítomnosti Ca^{2+} iontů do gelu nepronikl CaM, protože vznikající komplex znemožnil pohyb CaM směrem do gelu. V dráze 2 byl identifikován pouze molární přebytek CaM, který neměl již molekuly TRPC6 CT (801-878) k interakci. V reakčních podmínkách pozitivně nabitý TRPC6 CT (801-878) o pI 9,3 se do gelu vůbec nedostal, jak potvrdila kontrola v dráze 6. Přídavek chelatačního činidla EGTA úplně eliminoval interakci mezi CaM a TRPC6 CT (801-878). Potvrdila to přítomnost CaM bez viditelné změny koncentrace v gelu (CaCl_2 ; dráhy 2-5). Byla tak ověřena závislost vazby na přítomnosti Ca^{2+} iontů.

4.1.4 Gelová permeační chromatografie

Vznik komplexu S100A1 a TRPC6 CT (801-878) závislého na Ca^{2+} byl potvrzen permeační chromatografií na koloně Superdex75 (Graf.2). Rozdělení směsi proteinů dochází v koloně s inertní náplní na základě molekulové hmotnosti, velikosti a tvaru molekul. Objemnější těžší proteiny nepronikají do prostoru vnitřní stacionární fáze a prochází kolonou dříve, než krátké a lehké molekuly, které kolonu opouští později. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5ml/min. Při této rychlosti byl retenční objem samotného kontrolního vzorku TRPC6 CT (801-878) 11,4ml, respektive pro lehčí biomolekulu S100A1 měl retenční objem hodnotu 12,2ml. V přítomnosti Ca^{2+} iontů u vzorku komplexu TRPC6 CT (801-878):S100A1 v molárním poměru 1:1 došlo k významné změně retenčního objemu na 10,3ml a vzorek opustil kolonu dříve než samotné kontroly. Patrné je lokální maximum na úrovni retenčního objemu pro samostatný vzorek S100A1, které poukazuje na přebytek S100A1 ve směsném vzorku.



Graf.2.: Gelové permeační chromatografie TRPC6 CT (801-878) a S100A1

Gelová permeační chromatografie konstruktů TRPC6 CT (801-878) (modrá křivka), protein S100A1 (světlehnědá křivka) a jejich komplex TRPC6 CT (801-878)/S100A1 (šedá křivka). Proteiny se v prostředí obsahující Ca^{2+} ionty pohybují kolonou s retenčním objemem 11,4ml pro samostatný TRPC6 CT (801-878) respektive 12,2ml pro samostatný S100A1. Jejich komplex v molárním poměru 1:1 je těžší a retenční objem byl menší 10,3ml. U komplexu byl přebytek S100A1 potvrzen menším maximem u retenčního objemu shodným pro S100A1.

4.1.5 Fluorescenční vazebné studie

Spektroskopicky byla metodou určení anizotropie fluorescence za rovnovážného stavu prověřena míra vlivu vybraných aminokyselin na vazbu komplexu TRPC6 CT (801-878) s CaM respektive S100A1. Pro menší molekulovou hmotnost byl kalmodulin a S100A1 podle protokolu opatřen fluorescenční dansylovou skupinou emitující záření s maximem při 520nm. Vliv Ca^{2+} iontů na formování komplexu byl ověřen titrací CaM, S100A1 za rovnovážného stavu. Zvyšující se naměřené hodnoty anizotropie naznačují

Ca²⁺ dependentní chování pro vznik komplexu (Graf 4) TRPC6 CT (801-878) s titrovaným CaM.

4.1.5.1 Vazebná studie TRPC6 CT (801-878) s kalmodulinem

Jednotlivé hodnoty anizotropie byly naměřeny pro mutantní konstrukty TRPC6 CT (801–878) R852A, TRPC6 CT (801–878) K856A, TRPC6 CT (801–878) R864A, TRPC6 CT (801–878) I857A, a dvojitý mutant TRPC6 CT (801–878) K859A/R860A. Parametr velikosti navázané frakce F_B TRPC6 CT (801-878) byl vypočten z rovnice (Rov.2) a vyneseno do grafu (Graf 3) v závislosti na vzrůstající koncentraci TRPC6 CT (801-878) jednotlivě pro titrační přídávky. Proložení grafu matematickým vztahem (Rov.3) byla získána hodnota disociační konstanty K_D pro daný konstrukt.

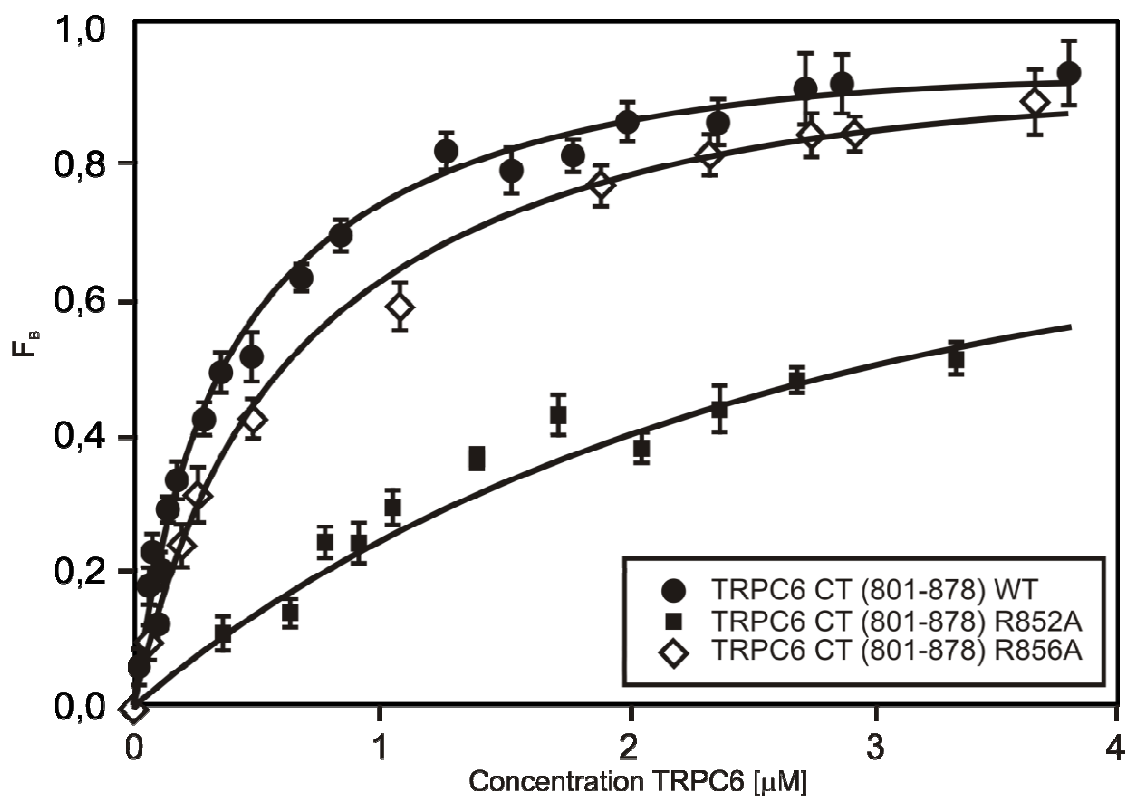
Disociační konstanta pro nepozměněný TRPC6 CT (801-878) WT interagující s CaM byla určena $K_D = 0,336 \pm 0,019 \mu\text{M}$. Navržené konstrukty s modifikovanými rezidui, u kterých byla předpokládána účast na možné interakci, byly též proměřeny. Určené disociační konstanty pro komplex s CaM přehledně shrnuje tabulka 2 (Tab.3).

Protein	Disociační konstanta K_D [μM]
TRPC6 _(801–878) WT	0,336 \pm 0,019
TRPC6 _(801–878) R852A	2,950 \pm 0,067
TRPC6 _(801–878) K856A	0,356 \pm 0,024
TRPC6 _(801–878) I857A	0,748 \pm 0,030
TRPC6 _(801–878) R864A	0,519 \pm 0,217
TRPC6 _(801–878) K859A/R860A	1,095 \pm 0,037

Tab.3.: Disociační konstanty pro konstrukty TRPC6 CT (801-878) s kalmodulinem

Tabulka shrnuje disociační konstanty zjištěné měřením anizotropie fluorescence pro konstrukt TRPC6 CT (801-878) WT v nezměněné formě (WT-wild type) a mutantních verzí. Velký vliv bazické aminokyseliny R852 na interakci s CaM, oproti TRPC6 CT (801-878) WT potvrzuje téměř 9 násobný nárůst disociační konstanty. Záměna lysinu K856 za alanin nepotvrdila vliv na vazbu s kalmodulinem, neboť disociační konstanta pro konstrukt K856 je téměř stejná jako u WT formy.

Konstrukty TRPC6 CT (801-878) R852, TRPC6 CT (801-878) R864, TRPC6 CT (801-878) I857 a konstrukt s dvojitou mutací TRPC6 CT (801-878) K859/R860 měly vliv na interakci s CaM, neboť došlo ke změnám disociačních konstant v porovnání s konstruktem TRPC6 CT (801-878) WT, který byl bez mutací. Zřejmě nejvýraznější podíl na vazbě kalmodulinu s TRPC6 má aminokyselina Arg852, jejíž mutantní formě TRPC6 CT (801-878) R852A odpovídala disociační konstanta $2,950 \pm 0,067 \mu\text{M}$. K narušení vazebného motivu došlo též mutací dvou sousedících aminokyselin Lys859/Arg860, zjištěná disociační konstanta TRPC6 CT (801-878) K859A/R8860A $1,095 \pm 0,037 \mu\text{M}$ odpovídala 3x násobku kontrolní K_D . Parciální vliv potvrdily disociační konstanty pro konstrukty se zaměněnými rezidui Ile857 a Arg864, konkrétně $0,748 \pm 0,030 \mu\text{M}$, respektive $0,519 \pm 0,217 \mu\text{M}$. Konstrukt s nahrazeným lyzinem K856 neměl změněnou schopnost vazby, neboť disociační konstanta TRPC6 CT (801-878) K856A byla určena $K_D = 0,356 \pm 0,024 \mu\text{M}$.



Graf 3.: Měření anizotropie v rovnovážném stavu vybraných konstruktů TRPC6 CT (801-878) s CaM naznačeným dansylchloridem

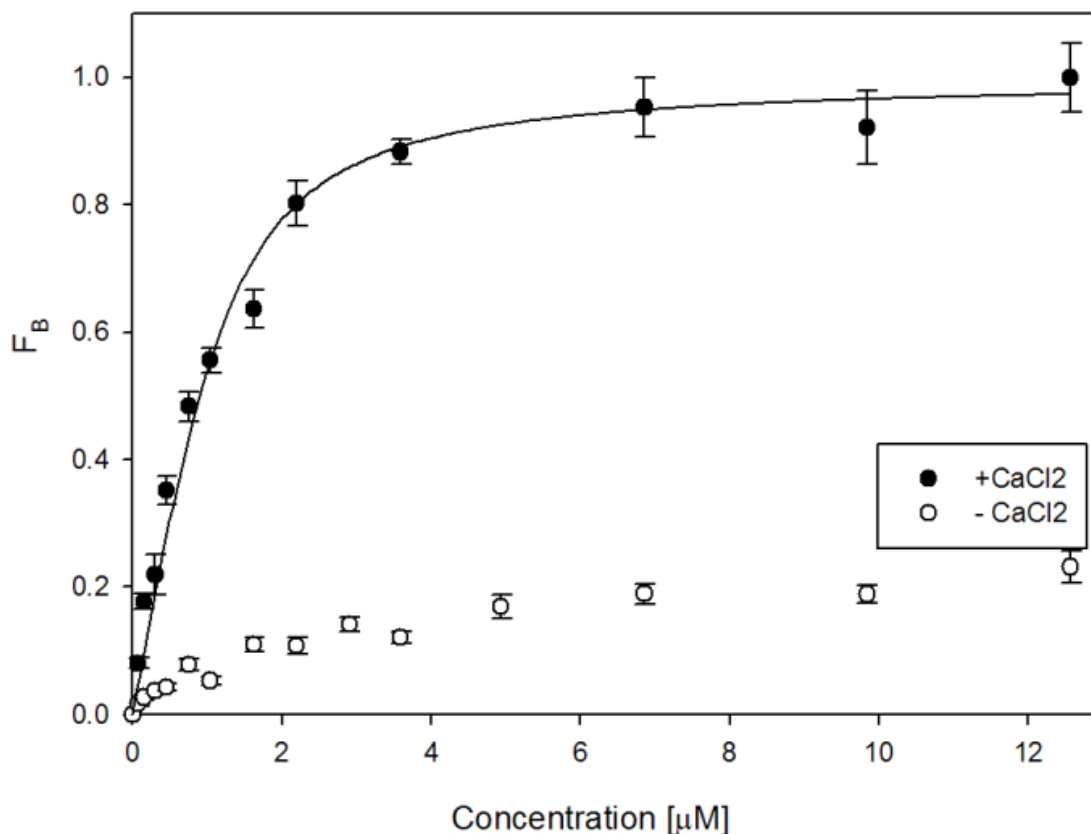
Jednotlivé hodnoty parametru F_B pro vybrané konstrukty TRPC6 CT (801-878) byly fitovány a určena disociační konstanta K_D pro komplex s CaM. Z grafu je patrné, že verze R852A (plný čtverec) měla zásadní vliv na interakci mezi TRPC6 CT (801-878) a CaM. Měření pro konstrukt bez změny je popsáno jako TRPC6 CT (801-878) WT (plný kruh). Disociační konstanta konstruktu TRPC6 CT (801-878) K856A (prázdný čtverec) byla řádově stejná jako u nezměněné WT formy.

4.1.5.2 Vazebná studie TRPC6 CT (801-878) s S100A1

Podobně jako kalmodulin je i S100A1 protein schopen vázat Ca^{2+} ionty a regulovat aktivitu TRPC6 kanálu. Experiment byl navržen analogicky k vazebné studii s kalmodulinem. S100A1 byl opatřen fluorescenční sondou reakcí s dansylchloridem a bylo provedeno spektroskopické měření anizotropie fluorescence za rovnovážného stavu v křemenné kyvetě za přítomnosti Ca^{2+} iontů.

Nepostradatelná funkce a závislost formování komplexu S100A1 – TRPC6 CT (801-878) WT na Ca^{2+} iontech byla ověřena měřením titrovaných vzorků při absenci Ca^{2+} iontů. Výsledek je patrný z grafu (Graf.4). V přítomnosti Ca^{2+} iontů docházelo k

formování komplexu, změnila se velikost rotující molekuly, což následně zvyšovalo anizotropii emitované fluorescence, na rozdíl od experimentu bez Ca^{2+} iontů, kdy naznačený S100A1 neinteragoval s CT (801-878) WT, proto anizotropie zůstávala stejná bez významné změny.



Graf. 4.: Vliv Ca^{2+} iontů na vznik komplexu TRPC6 CT (801-878) WT - S100A1

Přítomnost Ca^{2+} iontů má vliv na interakci mezi TRPC6 CT (801-878) a S100A1. Dependentní vazba komplexu TRPC6 CT (801-878) a S100A1 na Ca^{2+} iontech, podobně jako u CaM, byla ověřena měřením anizotropie fluorescence. V přítomnosti dvojmocných iontů vápníku došlo k nárůstu měřené anizotropie fluorescence (plný kruh) se zvyšující koncentrací TRPC6 CT (801-878) WT. Při absenci iontů, podobný jev nebyl pozorován (prázdný kruh). Rotační pohyb značené molekuly S100A1 nebyl ovlivněn navázáním molekuly TRPC6 CT (801-878) WT, proto anizotropie fluorescence zůstávala stejná.

Vzniklý komplex poukázal na skutečnost, že S100A1 je schopen interagovat se stejnou oblastí CIBR domény TRPC6 CT jako kalmodulin. Míra vlivu jednotlivých

bazických aminokyselinových reziduí na tuto interakci byla zjištěna z naměřených dat pro připravenou sadu mutantních konstruktů TRPC6 CT (801–878) R852A, TRPC6 CT (801–878) K856A, TRPC6 CT (801–878) R864A a trojitých mutantů TRPC6 CT (801–878) R852A/K859A/R860A, TRPC6 CT (801–878) K859A/R860A/R864A.

Z naměřených hodnot anizotropie fluorescence za rovnovážného stavu (Graf 5) aplikací matematických vztahů (Rov.2, Rov.3) byla vypočtena navázaná frakce a proložením grafu matematickou funkcí zjištěna disociační konstanta pro dané konstrukty TRPC6 CT (801-878). Tyto hodnoty disociačních konstant jsou uvedeny v tabulce (Tab.4).

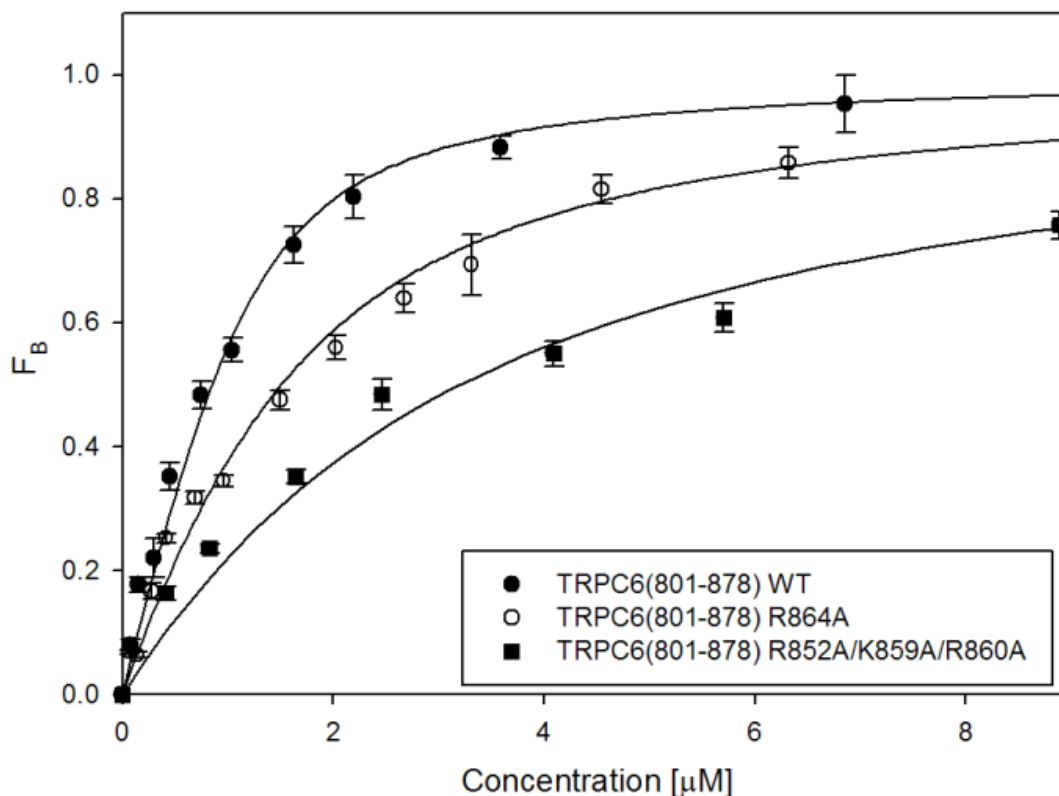
Protein	Disociační konstanta [μM]
TRPC6 _(801–878) WT	0,31 \pm 0,042
TRPC6 _(801–878) R852A	0,48 \pm 0,027
TRPC6 _(801–878) K856A	0,76 \pm 0,086
TRPC6 _(801–878) R864A	0,92 \pm 0,082
TRPC6 _(801–878) R852A/K859A/R860A	2,62 \pm 0,217
TRPC6 _(801–878) K859A/R860A/R864A	0,40 \pm 0,050

Tab.4.: Disociační konstanty pro konstrukty TRPC6 (801-878) CT s S100A1

Vliv vybrané aminokyseliny na vazbu komplexu TRPC6 CT (801-878) a S100A1 byl popsán disociačními konstantami. Konstrukt TRPC6 CT (801-878) WT bez mutací (WT-wild type), $K_D = 0,31 \pm 0,042\mu\text{M}$, měl srovnatelnou disociační konstantu s CaM. Velmi důležitou oblast pro vazbu komplexu ukázala disociační konstanta TRPC6 CT (801–878) R852A/K859A/R860A, která byla 8x větší než kontrolní WT. Jednotlivé mutantní formy se taktéž lišily, což potvrzuje participaci na interakci při vzniku komplexu.

Konstrukt bez mutací v sekvenci TRPC6 CT (801-878) WT měl $K_D = 0,31 \pm 0,042\mu\text{M}$ a sloužil jako kontrolní vzorek pro porovnávání vlivu mutace na vazbu. K 8mi násobnému zvýšení disociační konstanty na $2,62 \pm 0,217\mu\text{M}$ došlo u konstruktů se třemi zaměněnými rezidui Arg852/Lys859/Arg860. Další testované konstrukty měly menší negativní vliv na interakci TRPC6 CT (801-878) s S100A1. Částečný podíl na vazbě k

S100A1 má Arg864, Lys856 a Arg852 jejichž disociační konstanty K_D byly určeny na $0,92 \pm 0,082 \mu\text{M}$; $0,76 \pm 0,086 \mu\text{M}$ respektive $0,48 \pm 0,027 \mu\text{M}$. U trojitého mutantu TRPC6 CT (801–878) K859A/R860A/R864A byla K_D určena $0,40 \pm 0,050 \mu\text{M}$. Nahrazené aminokyseliny Lys859/Arg860/Arg864 neměly na vznik komplexu tak zásadní vliv, jak to mu bylo u trojitého mutantu TRPC6 CT (801–878) R852A/K859A/R860A.



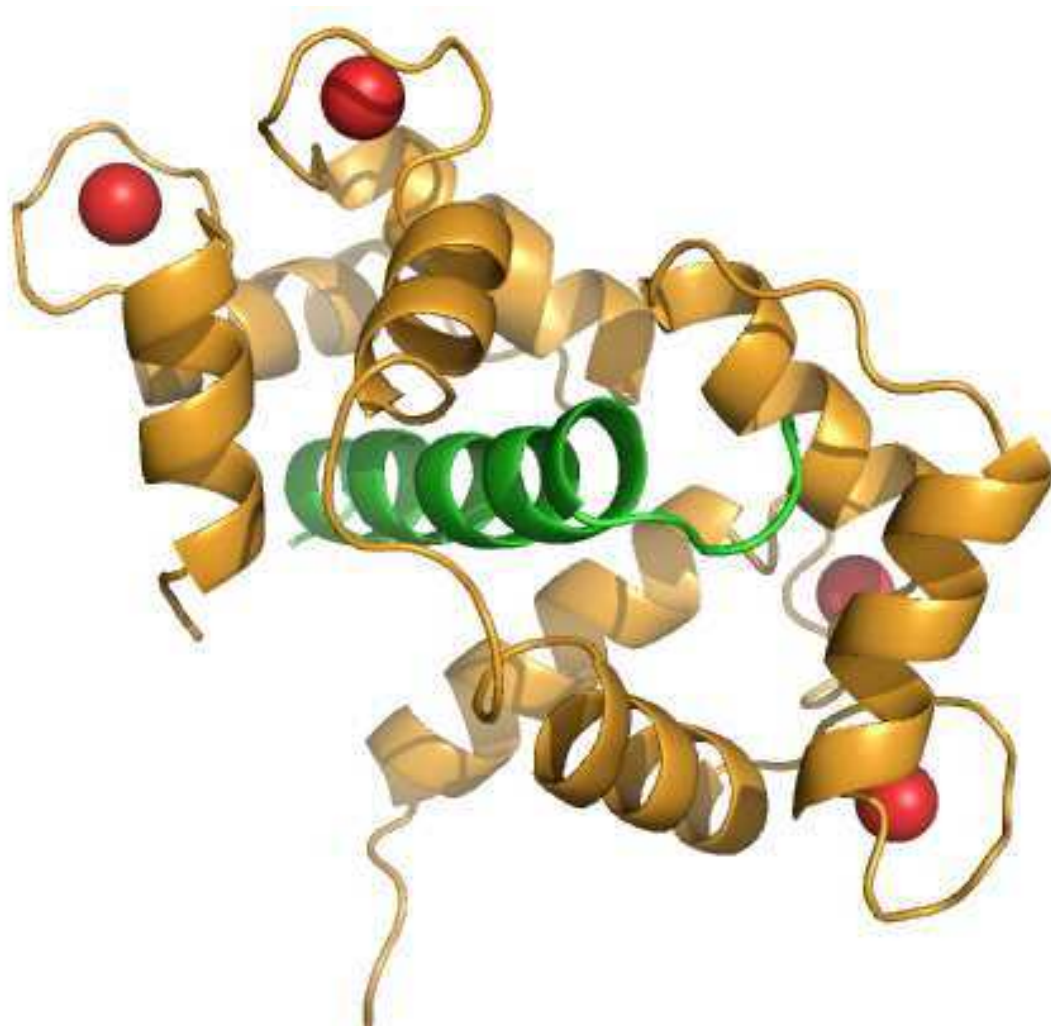
Graf. 5.: Měření anizotropie v rovnovážném stavu vybraných konstruktů TRPC6 CT s naznačeným S100A1

Anizotropie fluorescence S100A1 titrovaných fragmenty TRPC6 CT (801-878) jsou graficky znázorněné pro nepozměněnou verzi TRPC6 CT (801-878) bez mutací WT („wild type“) (černý kruh), mutovaný R864A konstrukt (bílý kruh), konstrukt s trojitou mutací (černý čtverec) Vliv mutace R864A na průběh titrace je patrný z grafu srovnáním s TRPC6 CT (801-878) WT bez mutací. Nejvýraznější inhibiční vliv na vznik komplexu s S100A1 měl trojitý pozmeněný konstrukt TRPC6 CT (801-878) R852/K859/R860, který měl disociační konstantu $2,62 \pm 0,217 \mu\text{M}$, což bylo 8mi násobné zvýšení oproti (TRPC6 CT (801-878) WT.

Vazebné studie ukázaly, že S100A1 a kalmodulin tvoří s C terminálním koncem TRPC6 CT (801-878) komplex se srovnatelnými disociačními konstantami K_D ($TRPC6_{CaM}$) = $0,336 \pm 0,019 \mu M$ a K_D ($TRPC6_{S100A1}$) = $0,31 \pm 0,042 \mu M$. Oba Ca^{2+} vazebné proteiny využívají stejnou oblast při tvorbě komplexu. Bodové mutace však odhalily, že krátký α -helix v tomto regionu nereaguje identicky s CAM a S100A1. Z disociačních konstant pro kalmodulin byl určen motiv 1-5-10, který nejlépe popisoval pozorované inhibiční vlivy jednotlivých bazických reziduí, hlavně Arg852, který měl u komplexu TRPC6 - CaM největší rušivý efekt. Naproti tomu komplex TRPC6 - S100A1 byl nahrazením Arg852 omezen jen částečně.

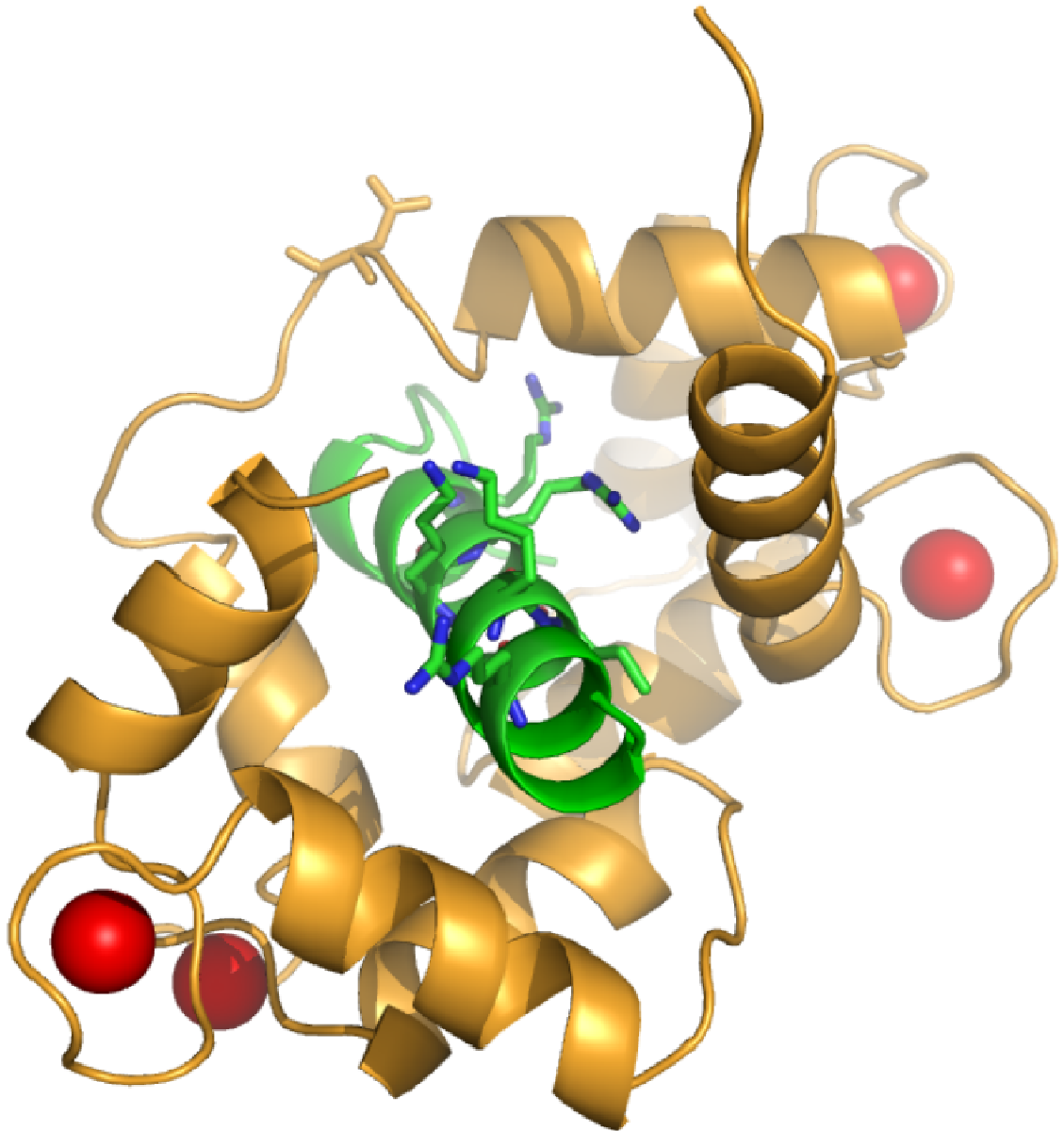
4.1.6 Homologní model komplexu C terminálního TRPC6 s kalmodulinem

Pro lepší a komplexní pochopení získaných dat charakterizující interakci kalmodulinu s C terminálním koncem TRPC6 byl vytvořen homologní model (Obr. 16). Ten zahrnuje část TRPC6 CT sekvence s regionem včetně CIBR domény s α -helikální strukturou obsahující sekvenční vázající motiv pro kalmodulin. Vazebný motiv má převážně hydrofobní charakter a má několik bazických aminokyselin (Rhoads and Friedberg 1997). Předlohou pro počítačový model byly použity struktury draselného kanálu RSK2 (Caterina, Schumacher et al. 1997) a peptidu z lidské „death-associated“ proteinkinázy 2 interagujícího s CaM (Zhang, Majava et al. 2009). Templáty pro homologní model obsahovaly konzervované sekvenční motivy pro vazbu kalmodulin, konkrétně 1-5-10 a 1-8-14 podobně jako C terminální konec TRPC6 CT (801-878), u kterého byl odhalen analýzou sekvence.



Obr. 16.: Strukturní počítačový model komplexu kalmodulinu s fragmentem TRPC6 CT (801-878)

Molekula kalmodulinu (zlatá barva) obsahuje navázané 4 molekuly vápenatých iontů (červené barva). Úsek α -helixu z fragmentu TRPC6 CT (801-878) s vazebným motivem (zelená barva). Navázáním Ca^{2+} iontů se odkryje vazebný region interagující přímo s bazickými aminokyselinami TRPC6 CT (801-878). Kalmodulin celý fragment obalí a pevně sevře. Zúčastněné aminokyseliny interakce byly zvýrazněny na dalším obrázku (Obr. 17)



Obr.17.: Pohled na komplex TRPC6 CT (801-878) s kalmodulinem

Fragment TRPC6 CT (801-878) s vazebným motivem (zelená barva). Na modelu jsou zvýrazněné bazické aminokyselinové zbytky Arg852, Lys856, Ile857, Lys859 a Arg860, které měly významný vliv na interakci s kalmodulinem. Molekula kalmodulinu (zlatá barva) obsahuje navázané 4 molekuly vápenatých iontů (červená barva). Z modelu je patrné, že postranní řetězce testovaných aminokyselin mají vliv na vazbu, neboť krátké prostorové vzdálenosti a náboj pomáhají při tvoření komplexu. Záměna těchto AMK bodovou mutací za alanin oslabilo interakci a zvýšilo disociační konstanty u mutantních forem.

Z hlediska struktury model naznačuje důležitou roli některých bazických reziduí zapojenou do vazby TRPC6-CaM, které byly potvrzeny i výsledky spektroskopického měření anizotropie fluorescence. Aminokyseliny Lys856, Lys859 a Arg860 podle modelu interagují s negativně nabitými rezidui kalmodulinu, a podobně je tomu u hydrofobního aminokyselinového zbytku Ile857, který je schopen interagovat s kalmodulinovými rezidui. Na základě informací ze sekvenční analýzy a získaných poznatků, se zdá velice pravděpodobné, že TRPC6 CT, mající v CIBR regionu více sekvenčních motivů pro interakci s kalmodulinem, preferuje v tomto případě motivem 1-5-10 před rozpoznávací sekvencí IQ a motivem 1-8-14.

4.2 DISKUZE

4.2.1 TRPC6 Kalmodulin

Vápník vázající protein kalmodulin má důležitou roli v regulaci aktivity TRPC6 iontového transmembránového kanálu (Kwon, Hofmann et al. 2007). Byla potvrzena přítomnost více vazebných míst pro kalmodulin na TRPC receptorech, která je společným znakem této podrodiny TRP proteinů. U TRPC1/2/4/5 byly identifikovány kalmodulin interagující domény na obou intracelulárních koncích, které jsou vzdáleny od CIBR regionu (Ordaz, Tang et al. 2005; Zhu 2005). Příbuznost TRPC3/6/7 dokazuje i výskyt jediného místa obsahující sekvenční vazebné motivy pro kalmodulin, případně proteiny s „*EF hand*“ motivem. Ačkoliv bylo potvrzeno, že C terminální konec hraje důležitou roli v interakci TRPC6 s kalmodulinem (Kwon, Hofmann et al. 2007), přesné místo v rámci aminokyselinové sekvence je zatím stále neznámé. Přes absenci 3D strukturního modelu TRPC6 receptoru se podařilo imunoprecipitačními experimenty a vazebnými „*pull down*“ studii (*pull down* – afinitní chromatografická metoda používající protein-protein interakce, na rozdíl od imunoprecipitace, která používá protilátky) upřesnit oblast TRPC6, která s kalmodulinem interaguje.

Schopnost vázat kalmodulin byla potvrzena i pro navržený konstrukt TRPC6 CT (801-878) metodami elektroforetické pohyblivosti v nativním polyakrylamidovém gelu, gelovou permeační chromatografií a takéž spektrofotoskopickou metodou měření anizotropie fluorescence. Charakter vazby byl určen jako silně dependentní na Ca^{2+} iontech. Pozitivní výsledky elektroforézy v nativním prostředí, gelové permeační chromatografie poukázaly na vznik komplexu kalmodulinu s TRPC6 CT (801-878) v oblasti na C konci zvané CIBR regionu. Při odstranění vápenatých iontů chelatačními činidly došlo k narušení vazby komplexu TRPC6 CT (801-878).

Titrace CaM za nativních podmínek upřesnila vazebný stechiometrický poměr 1:1. SDS elektroforézou v nedenedurujícím prostředí se přebytek CaM při poměru menším než 1:1 podařilo identifikovat v gelu. Stejně výsledky byly získány gelovou permeační chromatografií, kdy při nadbytku CaM (poměr větší než 1:1) nezreagovaná část měla na chromatogramu lokální maximum odpovídající samostatnému CaM.

Gelová permeační chromatografie prokázala existenci vazebného místa TRPC6 CT (801-878) a stechiometrický poměr, kdy jedna molekula TRPC6 CT reaguje s jednou molekulou CaM.

Sekvenční analýza odhalila CIBR doménu u TRPC rodiny přítomnou u všech členů. Predikcí pomocí databáze cílových molekul (Calmodulin target database - <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/>) poukázala na několik známých motivů, které rozpoznávají kalmodulin (Rhoads and Friedberg 1997). Dosud bylo popsáno několik druhů těchto kalmodulin preferujících motivů, jako jsou IQ, 1-5-10, 1-8-14, které vycházejí z konzervovaných pozic aminokyselin v sekvenci, které mají převážně hydrofobní charakter a nesou pozitivní náboj.

Pro bližší určení údajné vazebné domény byl navržen rekombinantní konstrukt TRPC6 CT (801-878) obsahující oblast zájmu. Metodou cirkulárního dichroismu byla naměřena spektra pro TRPC6 CT (801-878) WT, CaM, respektive S100A1 a samozřejmě utvořený komplex fúzního proteinu TRPC6 CT (801-878) s CaM respektive S100A1. Byla zjištěna sekundární struktura konstruktů TRPC6 CT (801-878) s oblastí interagující s kalmodulinem, která byla predikována analýzou primární sekvence. Přítomnost α -helixu potvrdilo předpoklad vazebného místa, které má charakter krátkého nepřerušovaného α -helikálního úseku s patřičným rozpoznávacím motivem (Zhu 2005). Data u fúzního proteinu TRPC6 CT (801-878) popř. mutantních verzí ukázala, že fragment TRPC6 v porovnání s CaM nebo S100A1 zaujímá většinou neuspořádanou strukturu. Jako možný důsledek při tvorbě komplexu byla sledována změna v sekundární struktuře. Avšak výsledná CD měření naznačila, že vznik komplexu TRPC6 CT (801-878) s kalmodulinem respektive S100A1 nemá podstatný vliv na sekundární strukturu TRPC6 CT, neboť spektrum komplexu odpovídá součtu jednotlivých spekter změřené pro proteiny samostatně.

V práci byly studovány bazické aminokyseliny v CIBR vazebném regionu TRPC6, které by mohly interagovat s negativně nabitými rezidui kalmodulinu (Rhoads and Friedberg 1997). Sledovány byly substituce těchto bazických aminokyselin s hydrofobním charakterem na interakci, podobně jak tomu bylo u charakterizace C terminálního konce u iontového kanálu TRPV1 (Grycova, Lansky et al. 2008). Za účelem prozkoumání úlohy jednotlivých aminokyselinových reziduí s údajným

kalmodulin vazebným regionem na TRPC6 byly navrženy substituce vybraných aminokyselin, které byly bodovou mutací provedeny a následně mohlo dojít k produkci proteinových fragmentů TRPC6 CT (801-878).

S těmito rekombinantně vyprodukovanými konstrukty TRPC6 nesoucí část C - terminálního konce včetně kalmodulin vazebného místa byla naměřena data anizotropie fluorescence za rovnovážného stavu, kdy se sledovala vazba fluorescenčně označeného kalmodulinu s jednotlivými konstrukty. Všechny exprimované proteiny se podařilo produkovat v rozpustné formě a v dostatečném množství pro spektroskopické studie a vazebné experimenty. Titrační pokusy potvrdily, že vznikající komplex TRPC6-CaM je závislý na přítomnosti Ca^{2+} iontů, což bylo zjištěno též při imunoprecipitačních experimentech (Kwon, Hofmann et al. 2007). Metodou měření anizotropie byla vazba charakterizována určením disociační konstanty pro komplex CaM navázaný na C terminální konec TRPC6 CT (801-878) ($K_D = 0,336 \pm 0,019\mu\text{M}$). Hodnota je v souladu s disociačními konstantami určenými pro podobné kalmodulin vázající části kanálů jako např. $\text{IP}_3\text{R1}$ receptor (Yamada, Miyawaki et al. 1995), TRPC6 (Tang, Lin et al. 2001) nebo P/Q-tyt vápníkového kanálu (Lee, Wong et al. 1999).

Vazebné studie s mutovanými konstrukty ukázaly, že každý z nich narušil interakci komplexu do určité míry. Projevil se inhibiční vliv na vznik komplexu. Neutralizace jedné aminokyseliny nebo kombinace dvou reziduí se neprojevila úplnou inhibicí vazby kalmodulinu. Inhibiční vliv na vazbu kalmodulinu byl pozorován u následující dvojité substituce Lys859/Arg860 za alaniny, kdy disociační konstanta byla určena $K_D = 1,095 \pm 0,037\mu\text{M}$. V případě nahrazení Arg852 alaninem byla zjištěna disociační konstanta dokonce $K_D = 2,950 \pm 0,067\mu\text{M}$. U bazického Arg864 a hydrofobního Ile857 byl negativní vliv substituce za alanin na vznikající vazbu komplexu potvrzen disociační konstantou $K_D = 0,519 \pm 0,030\mu\text{M}$, respektive $K_D = 0,748 \pm 0,028\mu\text{M}$ pro Ile857. Tyto bazické aminokyseliny se pravděpodobně přímo podílí na interakci TRPC6 CT s CaM. Účast bazických reziduí při tvorbě komplexu s kalmodulinem byla popsána i pro další členy TRP rodiny iontových kanálů (Grycova, Lansky et al. 2008) (Holakovska, Grycova et al. 2012). Byla ověřena i závislost komplexu na přítomnosti Ca^{2+} iontů, kdy za jejich přítomnosti došlo k interakci TRPC6 CT (801-878) s CaM, která se projevila nárůstem anizotropie,

protože vzniklý komplex měl odlišný rotační pohyb než samotná molekula značeného CaM.

Na základě informací ze sekvenční analýzy a získaných poznatků se zdá velice pravděpodobné, že TRPC6 CT má v CIBR regionu více sekvenčních motivů vyhovujících vazbě s kalmodulinem, 1-5-10, 1-8-14, IQ. (Zhu 2005). Pro upřesnění a lepší pochopení interakce kalmodulinu s C terminálním koncem TRPC6 byl vytvořen počítačový homologní model zmíněného regionu s CaM. Jako templáty pro homologní modelování byla použita struktura draselného kanálu RSK2 (Caterina, Schumacher et al. 1997) a peptidu z lidské „death-associated“ proteinkinázy 2 interagujícího s CaM (Zhang, Majava et al. 2009). Potvrzen byl předpoklad o charakteru vazebného motivu, že typické je hydrofobní oblast obsahující bazické aminokyseliny (Rhoads and Friedberg 1997). Z predikovaných vazebných motivů pro CaM 1-5-10, 1-8-14, IQ. (Zhu 2005) nejlépe vysvětluje motiv 1-5-10 inhibiční vlivy mutací Arg852, Lys859 a Arg860 včetně částečné inhibice zaměněné aminokyseliny Ile857. Model názorně ukazuje důležitost vybraných aminokyselin, které jsou velmi příznivě v prostoru orientovány k negativně nabitým postranním řetězcům aminokyselin kalmodulinu, se kterými při vzniku komplexu TRPC6 CT a CaM dochází k interakci.

4.2.2 TRPC6 a S100A1

Rodina S100 proteinů se zapojuje do různých biologických odpovědí změnou buněčné koncentrace vápníku. Fungují jako vápník signální molekuly a jsou schopny modulovat enzymovou aktivitu, oligomerizaci cytoskeletárních proteinových komponent (tubulin, desmin, atd.), napomáhají ubiquitinaci, řídí tvorbu membránových vesikul a dopravu proteinů na vnitřní povrch cytoplazmatické membrány (Santamaria-Kisiel, Rintala-Dempsey et al. 2006).

Interakce TRP kationtových kanálů s rodinou S100 byla zjištěna u receptorů TRPV5 a TRPV6 imunoprecipitačními experimenty a kvasinkovým hybridním systémem (van de Graaf, Hoenderop et al. 2003; Borthwick, Neal et al. 2008). Vzniklý komplex S100A10 s receptory a následně s annexinem II pomáhá správně dopravit TRPV5 a TRPV6 kanály na cytoplazmatickou membránu, kde potom fungují jako selektivní kanály pro Ca^{2+} ionty. Přímá interakce mezi S100A1 a iontovým kanálem

TRPM3 byla prokázána dokonce s možnou kompeticí o vazebnou doménu mezi S100A1 a kalmodulinem, protože jejich sekvenční vazebné motivy se překrývají (Holakovska, Grycova et al. 2012).

S100A1 je vápník vázající protein mající dva „*EF hand*“ motivy s odlišnou afinitou pro Ca^{2+} ionty. Podobně jako u kalmodulinu, je navázání vápenatých iontů u S100A1 doprovázeno konformačními změnami ve struktuře, při kterých se odhaluje potenciální vazebná oblast pro cílové proteiny. Přímá interakce mezi fragmentem TRPC6 CT (801-878) a S100A1 byla zjištěna gelovou permeační chromatografií a následně potvrzena i fluorescenčním měřením anizotropie pouze za přítomnosti Ca^{2+} iontů, což ukazuje na dependentní vazbu komplexu na Ca^{2+} iontech. Stejné chování TRPC6 bylo pozorováno při experimentech s kalmodulinem.

Pro bližší charakterizaci této interakce byl použit navržený konstrukt TRPC6 CT (801-878) obsahující oblast CIBR regionu, se kterou reaguje kalmodulin. V sekvenci byly vybrány aminokyseliny s bazickými vlastnostmi, které jsou potenciálně zapojeny do interakce s negativně nabitými aminokyselinovými zbytky kalmodulinového „*EF-hand*“ motivu zjištěným vazebnými experimenty u TRPV1 (Grycova, Lansky et al. 2008) a TRPC6 (Friedlova, Grycova et al. 2010). Nahrazením aminokyselin bodovou mutací za alanin vznikly mutované verze konstrukt TRPC6 CT (801-878), které se podařilo produkovat v bakteriálním systému E.coli. Fúzní protein byl exprimován v rozpustné formě a dvojestupňovou purifikací bylo získáno dostatečné množství proteinu pro vazebné experimenty. Histagová kotva ulehčující purifikaci nakonec byla ponechána na konstrukt TRPC6 CT (801-878) kvůli nízké agregaci proteinu, ke které docházelo při trombinovém odštěpení histagové kotvy. Cílový protein S100A1 byl purifikován fenylsefarózou CL-4B za přítomnosti Ca^{2+} iontů, čímž se podařilo izolovat pouze správně fungující molekuly S100A1, které byly následně použity pro vazebné experimenty.

Sekundární struktura byla ověřena měřením cirkulárního dichroismu. Relativní zastoupení α -helikální struktur potvrzuje správně fungující nativní protein. Data cirkulární dichroismu byla v souladu s předpokladem, že vazba S100A1 nebude mít zásadní vliv na strukturu TRPC6 CT (801-878) podobně, jak tomu bylo u CaM. Výsledky měření cirkulárního dichroismu C terminálního fragmentu TRPC6 odpovídaly

matematické analýze z primární struktury, protože TRPC6 CT (801-878) zaujímal neuspořádanou oblast (36%) s α -helixem, který obsahoval vazebný motiv pro možnou interakci s Ca^{2+} vazebnými proteiny.

Existence komplexu TRPC6 CT (801-878) s S100A1 byla potvrzena gelovou permeační chromatografií, SDS elektroforézou v neredukujícím prostředí a charakterizován disociační konstantou získanou měřením anizotropie fluorescence. S100A1 je menší protein než CaM a obsahuje jen 2 „*EF-hand*“ motivy, a přesto molární poměr jednotlivých složek komplexu byl 1:1, přebytečný proteinový zbytek šlo identifikovat na chromatogramu z gelové permeační chromatografie.

Bazické aminokyseliny v CIBR vazebném regionu TRPC6, které interagovaly s negativně nabitými rezidui kalmulinu, byly zkoumány i pro S100A1. Naznačený S100A1 fluorescenční sondou dansylchloridem postupně interagoval s rekombinantními mutanty TRPC6 CT (801-878). Určené disociační konstanty charakterizovaly vliv dané mutace na sílu komplexu, a tak i důležitost aminokyseliny na vznik komplexu.

Disociační konstanta TRPC6 CT (801-878) WT s S100A1 byla určena $K_D = 0,31 \pm 0,042 \mu\text{M}$. Tato hodnota koreluje s hodnotami pro cílové molekuly S100A1, které se pohybují v rozsahu 0,2 až 0,5 μM . Pro porovnání s RyR receptorem byla K_D zjištěna 0,383 μM (Treves, Scutari et al. 1997). Částečný rušivý a inhibiční vliv bodových mutací TRPC6 CT (801-878) na interakci s S100A1 byl zjištěn u většiny vybraných aminokyselin. K úplné inhibici došlo pouze v případě odstranění Ca^{2+} iontů z reakce chelatačním činidlem. Největší vliv na vazbu S100A1 způsobila trojitá mutace Arg852/Lys859/Arg860 ($K_D = 2,62 \pm 0,217 \mu\text{M}$), disociační konstanta konstruktu byla 8x vyšší než v případě nepozměněného TRPC6 CT (801-878) WT. Trojitá mutace byla navržena, protože jednoduché nahrazení Arg852 alaninem a dvojmutace Lys859/Arg860 na konci α -helixu měly jedny z největších vlivů u CaM. O identický vazebný motiv a místo pro S100A1 a CaM zřejmě nejde, neboť konstrukt TRPC6 CT (801-878) R852A měl disociační konstantu $K_D = 0,48 \pm 0,027 \mu\text{M}$ a neprojevila se očekávaná důležitost této aminokyseliny na vznik komplexu, jak tomu bylo u CaM. Negativní vliv substituce bazického Lys856, Arg864 za alanin na vznikající vazbu komplexu potvrzen disociační konstantou $K_D = 0,76 \pm 0,086 \mu\text{M}$ pro Lys856, respektive

$K_D = 0,92 \pm 0,082 \mu\text{M}$ pro Arg864. Tyto aminokyseliny se pravděpodobně přímo podílí na interakci TRPC6 s S100A1.

S100A1 se podařilo vykrytalovat v komplexu s ryanodinovými receptory (Treves, Scutari et al. 1997). Byl použit 12 aminokyselinový peptid, který nebyl dostatečným templátem pro homologní modelování, proto počítačový model pro komplex S100A1 a C terminální konec TRPC6 nebylo možné vytvořit.

4.2.3 TRPC6 a vápník vázající proteiny kalmodulin a S100A1

Vazebné studie ukázaly, že S100A1 a kalmodulin mají vysokou afinitu k C terminálnímu konci TRPC6 CT (801-878) a tvoří s ním komplex se srovnatelnými disociačními konstantami K_D ($K_D(\text{TRPC6}_{\text{CaM}}) = 0,336 \pm 0,019 \mu\text{M}$ a $K_D(\text{TRPC6}_{\text{S100A1}}) = 0,31 \pm 0,042 \mu\text{M}$). Oba Ca^{2+} vazebné proteiny využívají stejnou oblast při tvorbě komplexu (Kwon, Hofmann et al. 2007; Holakovska, Grycova et al. 2012). Bodové mutace v tomto regionu odhalily, že krátký α -helix reaguje s CaM vazebným motivem 1-5-10. Vazebné experimenty fragmentu TRPC6 CT (801-878) s S100A1 potvrdily zjištění, že α -helix váže i protein S100A1, ale jiným vazebným motivem než je tomu u CaM. Trojitá mutace aminokyselin Arg852/Lys859/Arg860 u S100A1 měla největší vliv na komplex TRPC6 - S100A1, ale mutace Arg852 již neměla takový vliv na komplex S100A1 – TRPC6 jak tomu bylo u komplexu CaM – TRPC6. Vazebná místa se překrývají a nejsou identická. Zjištění je v souladu s výsledky, které byly získány kompetičními vazebnými studiemi mezi S100A1 a CaM u ryanodinového receptoru (Rebbeck, Nitu et al. 2016)

5 ZÁVĚR

V této práci byla prověřena interakce konzervovaného regionu lokalizovaným na C terminálním konci TRPC6 receptoru s proteiny vázajícími Ca^{2+} ionty CaM a S100A1. Použitím molekulárně genetických metod se podařilo připravit proteinový fragment TRPC6 s tímto regionem, včetně mutantních verzí, které měly bodovou mutací zaměněny vybrané aminokyseliny. Vazebný region se podařilo charakterizovat a přiblížit jeho strukturu biofyzikálními metodami. Matematické a počítačové metody byly aplikovány při tvorbě homologního modelu.

Intracelulární C konec TRPC6 má neuspořádanou strukturu s nepřerušeným α -helixem, ke kterému mají CaM a S100A1 mají vysokou afinitu. V přítomnosti Ca^{2+} iontů dochází u vápník vázající proteinů ke konformačním změnám ve struktuře a k odhalení vazebné oblasti, která následně interaguje s lokalizovaným α -helixem TRPC6. Tento helix je součástí konzervované domény CIBR, která byla popsána u všech členů rodiny TRPC. Sekvenční analýzou bylo popsáno několik možných vazebných motivů, které byly ověřeny následně experimentálně. Vlivy vybraných bazických reziduí v oblasti CIBR domény u TRPC6 byly charakterizovány disociačními konstantami.

Interakce TRPC6 s CaM je zprostředkována rozpoznávacím motivem 1-5-10. Homologní model tohoto komplexu poukázal na důležitost aminokyselin Arg852, Ile857, pro vazbu. Výsledky vazebných experimentů odhalily, že komplex TRPC6 a S100A1 vzniká ve stejné oblasti α -helixu TRPC6, ale jiným způsobem, než tomu bylo u CaM. Rozpoznávací motivy se překrývají, neboť větší vliv na interakci S100A1 mají aminokyseliny na konci vazebného helixu, konkrétně Lys859 a Arg860.

Zjištěné informace upřesnily lokalizaci a charakter vazebného místa na C intracelulárním konci TRPC6. Odhalen byl S100A1 jako potenciální vazebný partner pro kanál TRPC6. Během laboratorní experimentální činnosti byl vypracován protokol pro purifikaci proteinových fragmentů TRP receptoru. Dizertační práce může sloužit jako výchozí krok budoucímu výzkumu charakterizace a modulace TRP kanálů.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmed, G. U. and A. B. Malik (2005). "Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability." *Pflugers Arch* **451**(1): 131-142.
- Amaral, M. D. and L. Pozzo-Miller (2007). "TRPC3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation." *J Neurosci* **27**(19): 5179-5189.
- Ambudkar, I. S., H. L. Ong, et al. (2007). "TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels." *Cell Calcium* **42**(2): 213-223.
- Authi, K. S. (2007). "TRP channels in platelet function." *Handb Exp Pharmacol* **179**: 425-443.
- Babu, Y. S., J. S. Sack, et al. (1985). "Three-dimensional structure of calmodulin." *Nature* **315**(6014): 37-40.
- Beech, D. J. (2005). "Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**(8): 597-603.
- Beech, D. J., K. Muraki, et al. (2004). "Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP." *J Physiol* **559**(Pt 3): 685-706.
- Berg, A. P., N. Sen, et al. (2007). "TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for metabotropic glutamate receptor signaling in rat striatal cholinergic interneurons." *J Neurosci* **27**(33): 8845-8856.
- Berna-Ero, A., C. Galan, et al. (2012). "Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets." *Biochim Biophys Acta* **1823**(8): 1242-1251.
- Bezzierides, V. J., I. S. Ramsey, et al. (2004). "Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels." *Nat Cell Biol* **6**(8): 709-720.
- Birnbaumer, L. (2009). "The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 395-426.
- Bolotina, V. M. (2008). "Orai, STIM1 and iPLA2beta: a view from a different perspective." *J Physiol* **586**(13): 3035-3042.
- Borthwick, L. A., A. Neal, et al. (2008). "The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia." *Cell Calcium* **44**(2): 147-157.
- Boulay, G., D. M. Brown, et al. (1999). "Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14955-14960.
- Boulay, G., X. Zhu, et al. (1997). "Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein." *J Biol Chem* **272**(47): 29672-29680.
- Brazer, S. C., B. B. Singh, et al. (2003). "Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca2+ influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1." *J Biol Chem* **278**(29): 27208-27215.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-824.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." *Nature* **426**(6966): 517-524.
- Cosens, D. J. and A. Manning (1969). "Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant." *Nature* **224**(5216): 285-287.

- Crandall, M., J. Kwash, et al. (2002). "Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus oocytes*." *Pain* **98**(1-2): 109-117.
- D'Esposito, M., M. Strazzullo, et al. (1998). "Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21-->q22." *Cytogenet Cell Genet* **83**(1-2): 46-47.
- Dasgupta, M., T. Honeycutt, et al. (1989). "The gamma-subunit of skeletal muscle phosphorylase kinase contains two noncontiguous domains that act in concert to bind calmodulin." *J Biol Chem* **264**(29): 17156-17163.
- DeHaven, W. I., B. F. Jones, et al. (2009). "TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1." *J Physiol* **587**(Pt 10): 2275-2298.
- Dietrich, A., V. Chubanov, et al. (2006). "Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells." *Pharmacol Ther* **112**(3): 744-760.
- Dietrich, A., M. Mederos y Schnitzler, et al. (2003). "N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity." *J Biol Chem* **278**(48): 47842-47852.
- Dietrich, A., Y. S. M. Mederos, et al. (2005). "Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice." *Mol Cell Biol* **25**(16): 6980-6989.
- Donato, R. (2001). "S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(7): 637-668.
- Donato, R. (2003). "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins." *Microsc Res Tech* **60**(6): 540-551.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
- Engelke, M., O. Friedrich, et al. (2002). "Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta." *FEBS Lett* **523**(1-3): 193-199.
- Estacion, M., W. G. Sinkins, et al. (2006). "Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca²⁺ permeability." *J Physiol* **572**(Pt 2): 359-377.
- Firth, A. L., C. V. Remillard, et al. (2007). "TRP channels in hypertension." *Biochim Biophys Acta* **1772**(8): 895-906.
- Freichel, M., S. H. Suh, et al. (2001). "Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice." *Nat Cell Biol* **3**(2): 121-127.
- Freichel, M., R. Vennekens, et al. (2005). "Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies." *J Physiol* **567**(Pt 1): 59-66.
- Friedlova, E., L. Grycova, et al. (2010). "The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin." *Neurochem Int* **56**(2): 363-366.
- Gailly, P. and M. Colson-Van Schoor (2001). "Involvement of trp-2 protein in store-operated influx of calcium in fibroblasts." *Cell Calcium* **30**(3): 157-165.
- Gaudet, R. (2009). "Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments." *J Gen Physiol* **133**(3): 231-237.
- Gentil, B. J., C. Delphin, et al. (2001). "The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B." *J Biol Chem* **276**(26): 23253-23261.

- Gibon, J., P. Tu, et al. (2011). "The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc." Biochim Biophys Acta **1808**(12): 2807-2818.
- Goel, M., W. Sinkins, et al. (2005). "Proteomic analysis of TRPC5- and TRPC6-binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na(+)/K(+)-ATPase." Pflugers Arch **451**(1): 87-98.
- Goel, M., W. G. Sinkins, et al. (2002). "Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes." J Biol Chem **277**(50): 48303-48310.
- Goodsell, D. S., S. Dutta, et al. (2015). "The RCSB PDB "Molecule of the Month": Inspiring a Molecular View of Biology." PLoS Biol **13**(5).
- Gottlieb, P., J. Folgering, et al. (2008). "Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity." Pflugers Arch **455**(6): 1097-1103.
- Graham, S., M. Ding, et al. (2007). "Downregulation of TRPC6 protein expression by high glucose, a possible mechanism for the impaired Ca²⁺ signaling in glomerular mesangial cells in diabetes." Am J Physiol Renal Physiol **293**(4): 15.
- Greka, A., B. Navarro, et al. (2003). "TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology." Nat Neurosci **6**(8): 837-845.
- Grycova, L., Z. Lansky, et al. (2008). "Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin." Biochem Biophys Res Commun **375**(4): 680-683.
- Gudermann, T., M. Mederos y Schnitzler, et al. (2004). "Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology?" Sci STKE **2004**(243): pe35.
- Hardie, R. C. (2001). "Phototransduction in *Drosophila melanogaster*." J Exp Biol **204**(Pt 20): 3403-3409.
- Hardie, R. C. and B. Minke (1995). "Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca²⁺ and trp." Cell Calcium **18**(4): 256-274.
- Harteneck, C., T. D. Plant, et al. (2000). "From worm to man: three subfamilies of TRP channels." Trends Neurosci **23**(4): 159-166.
- Hassock, S. R., M. X. Zhu, et al. (2002). "Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel." Blood **100**(8): 2801-2811.
- Haynes, W. J., X.-L. Zhou, et al. (2008). "Indole and other aromatic compounds activate the yeast TRPY1 channel." FEBS letters **582**(10): 1514-1518.
- Heizmann, C. W., G. Fritz, et al. (2002). "S100 proteins: structure, functions and pathology." Front Biosci **1**(7): d1356-1368.
- Hernandez-Ochoa, E. O., B. L. Prosser, et al. (2009). "Augmentation of Cav1 channel current and action potential duration after uptake of S100A1 in sympathetic ganglion neurons." Am J Physiol Cell Physiol **297**(4): C955-970.
- Hisatsune, C., Y. Kuroda, et al. (2004). "Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **279**(18): 18887-18894.
- Hofmann, T., A. G. Obukhov, et al. (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." Nature **397**(6716): 259-263.
- Hofmann, T., M. Schaefer, et al. (2000). "Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry." J Mol Med **78**(1): 14-25.
- Hofmann, T., M. Schaefer, et al. (2002). "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7461-7466.

- Holakovska, B., L. Grycova, et al. (2012). "Calmodulin and S100A1 protein interact with N terminus of TRPM3 channel." *J Biol Chem* **287**(20): 16645-16655.
- Hu, H. J., G. Bhave, et al. (2002). "Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia." *J Neurosci* **22**(17): 7444-7452.
- Chang, Y., G. Schlenstedt, et al. (2010). "Properties of the intracellular transient receptor potential (TRP) channel in yeast, Yvc1." *FEBS Lett* **584**(10): 2028-2032.
- Chevesich, J., A. J. Kreuz, et al. (1997). "Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex." *Neuron* **18**(1): 95-105.
- Chuang, H. H., W. M. Neuhauser, et al. (2004). "The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel." *Neuron* **43**(6): 859-869.
- Chuang, H. H., E. D. Prescott, et al. (2001). "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition." *Nature* **411**(6840): 957-962.
- Ikura, M., G. M. Clore, et al. (1992). "Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR." *Science* **256**(5057): 632-638.
- Ilatovskaya, D. V. and A. Staruschenko (2013). "Single-Channel Analysis of TRPC Channels in the Podocytes of Freshly Isolated Glomeruli." *Methods Mol Biol* **998**: 355-369.
- Inoue, R., T. Okada, et al. (2001). "The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel." *Circ Res* **88**(3): 325-332.
- Jardin, I., L. J. Gomez, et al. (2009). "Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca(2+) entry pathways." *Biochem J* **420**(2): 267-276.
- Jin, X., J. Touhey, et al. (2006). "Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel." *J Biol Chem* **281**(35): 25006-25010.
- Jordt, S. E. and D. Julius (2002). "Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers." *Cell* **108**(3): 421-430.
- Jung, S., A. Muhle, et al. (2003). "Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth." *J Biol Chem* **278**(6): 3562-3571.
- Jung, S., R. Strotmann, et al. (2002). "TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **282**(2): C347-359.
- Jurado, L. A., P. S. Chockalingam, et al. (1999). "Apocalmodulin." *Physiol Rev* **79**(3): 661-682.
- Kedei, N., T. Szabo, et al. (2001). "Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1." *J Biol Chem* **276**(30): 28613-28619.
- Kiewitz, R., G. E. Lyons, et al. (2000). "Transcriptional regulation of S100A1 and expression during mouse heart development." *Biochim Biophys Acta* **1498**(2-3): 207-219.
- Kim, B. J., I. So, et al. (2006). "The relationship of TRP channels to the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract." *J Smooth Muscle Res* **42**(1): 1-7.
- Kim, J. Y. and D. Saffen (2005). "Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels." *J Biol Chem* **280**(36): 32035-32047.

- Kim, M. S., W. Zeng, et al. (2009). "Native Store-operated Ca²⁺ Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1." *J Biol Chem* **284**(15): 9733-9741.
- Kim, S. J., Y. S. Kim, et al. (2003). "Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1." *Nature* **426**(6964): 285-291.
- Kiselyov, K. and R. L. Patterson (2009). "The integrative function of TRPC channels." *Front Biosci* **14**: 45-58.
- Klevit, R. E., D. C. Dalgarno, et al. (1984). "1H-NMR studies of calmodulin. The nature of the Ca²⁺-dependent conformational change." *Eur J Biochem* **139**(1): 109-114.
- Kohler, J. J. and A. Schepartz (2001). "Kinetic studies of Fos.Jun.DNA complex formation: DNA binding prior to dimerization." *Biochemistry* **40**(1): 130-142.
- Kwan, H. Y., Y. Huang, et al. (2004). "Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2625-2630.
- Kwan, H. Y., Y. Huang, et al. (2007). "TRP channels in endothelial function and dysfunction." *Biochim Biophys Acta* **8**: 907-914.
- Kwon, Y., T. Hofmann, et al. (2007). "Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6." *Mol Cell* **25**(4): 491-503.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum.
- Larsson, K. P., H. M. Peltonen, et al. (2005). "Orexin-A-induced Ca²⁺ entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation." *J Biol Chem* **280**(3): 1771-1781.
- Lee, A., S. T. Wong, et al. (1999). "Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels." *Nature* **399**(6732): 155-159.
- Lee, K. P., J. Y. Jun, et al. (2005). "TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells." *Mol Cells* **20**(3): 435-441.
- Lemonnier, L., M. Trebak, et al. (2008). "Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channel subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate." *Cell Calcium* **43**(5): 506-514.
- Liao, Y., C. Erxleben, et al. (2008). "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 2895-2900.
- Liao, Y., N. W. Plummer, et al. (2009). "A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3202-3206.
- Liman, E. R., D. P. Corey, et al. (1999). "TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5791-5796.
- Liman, E. R. and H. Innan (2003). "Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3328-3332.
- Liu, X., K. T. Cheng, et al. (2007). "Attenuation of store-operated Ca²⁺ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(44): 17542-17547.
- Liu, X., B. B. Singh, et al. (2003). "TRPC1 is required for functional store-operated Ca²⁺ channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region." *J Biol Chem* **278**(13): 11337-11343.

- Lu, M., R. Branstrom, et al. (2010). "Expression and association of TRPC subtypes with Orai1 and STIM1 in human parathyroid." *J Mol Endocrinol* **44**(5): 285-294.
- Lussier, M. P., S. Cayouette, et al. (2005). "MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC." *J Biol Chem* **280**(19): 19393-19400.
- Maroto, R., A. Raso, et al. (2005). "TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells." *Nat Cell Biol* **7**(2): 179-185.
- Meador, W. E., A. R. Means, et al. (1992). "Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex." *Science* **257**(5074): 1251-1255.
- Mio, K., T. Ogura, et al. (2007). "The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas." *J Mol Biol* **367**(2): 373-383.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." *Sci STKE* **22**(272).
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." *Neuron* **2**(4): 1313-1323.
- Mori, Y., T. Okada, et al. (1999). "[Receptor-activated Ca²⁺ influx: capacitative Ca²⁺ entry and TRP proteins]." *Nihon Yakurigaku Zasshi* **114**(3): 149-160.
- Mori, Y., M. Wakamori, et al. (2002). "Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes." *J Exp Med* **195**(6): 673-681.
- Most, P., S. T. Pleger, et al. (2004). "Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium." *J Clin Invest* **114**(11): 1550-1563.
- Most, P., H. Seifert, et al. (2006). "Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction." *Circulation* **114**(12): 1258-1268.
- Mottl, A. K., M. Lu, et al. (2013). "A novel TRPC6 mutation in a family with podocytopathy and clinical variability." *BMC Nephrol* **14**: 104.
- Nilius, B. and V. Flockerzi (2014). "Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface." *Handb Exp Pharmacol* **223**.
- Nilius, B. and G. Owsianik (2011). "The transient receptor potential family of ion channels." *Genome Biol* **12**(3): 2011-2012.
- Nishikawa, T., I. S. Lee, et al. (1997). "Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage." *J Biol Chem* **272**(37): 23037-23041.
- Numazaki, M., T. Tominaga, et al. (2003). "Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 8002-8006.
- Numazaki, M., T. Tominaga, et al. (2002). "Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues." *J Biol Chem* **277**(16): 13375-13378.
- Obukhov, A. G. and M. C. Nowycky (2008). "TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle." *J Cell Physiol* **216**(1): 162-171.
- Onions, J., S. Hermann, et al. (2000). "A novel type of calmodulin interaction in the inhibition of basic helix-loop-helix transcription factors." *Biochemistry* **39**(15): 4366-4374.
- Ordaz, B., J. Tang, et al. (2005). "Calmodulin and calcium interplay in the modulation of TRPC5 channel activity. Identification of a novel C-terminal domain for calcium/calmodulin-mediated facilitation." *J Biol Chem* **280**(35): 30788-30796.

- Owsianik, G., K. Talavera, et al. (2006). "Permeation and selectivity of TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 685-717.
- Palmer, C. P., X. L. Zhou, et al. (2001). "A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7801-7805.
- Pani, B., H. L. Ong, et al. (2008). "Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)." J Biol Chem **283**(25): 17333-17340.
- Pedersen, S. F., G. Owsianik, et al. (2005). "TRP channels: an overview." Cell Calcium **38**(3-4): 233-252.
- Perraud, A. L., A. Fleig, et al. (2001). "ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology." Nature **411**(6837): 595-599.
- Philipp, S., C. Trost, et al. (2000). "TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca²⁺-like channels in adrenal cells." J Biol Chem **275**(31): 23965-23972.
- Phillips, A. M., A. Bull, et al. (1992). "Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene." Neuron **8**(4): 631-642.
- Prosser, B. L., N. T. Wright, et al. (2008). "S100A1 binds to the calmodulin-binding site of ryanodine receptor and modulates skeletal muscle excitation-contraction coupling." J Biol Chem **283**(8): 5046-5057.
- Putney, J. W., Jr. (2004). "The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels." Trends Cell Biol **14**(6): 282-286.
- Ramsey, I. S., M. Delling, et al. (2006). "An introduction to TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 619-647.
- Rebbeck, R. T., F. R. Nitu, et al. (2016). "S100A1 does not compete with calmodulin for ryanodine receptor binding but structurally alters the ryanodine receptor/calmodulin complex." Journal of Biological Chemistry.
- Reiser, J., K. R. Polu, et al. (2005). "TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function." Nat Genet **37**(7): 739-744.
- Reppel, M., P. Sasse, et al. (2005). "S100A1 enhances the L-type Ca²⁺ current in embryonic mouse and neonatal rat ventricular cardiomyocytes." J Biol Chem **280**(43): 36019-36028.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." FASEB J **11**(5): 331-340.
- Riccio, A., Y. Li, et al. (2009). "Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior." Cell **137**(4): 761-772.
- Riccio, A., A. D. Medhurst, et al. (2002). "mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues." Brain Res Mol Brain Res **109**(1-2): 95-104.
- Rohde, D., J. Ritterhoff, et al. (2010). "S100A1: a multifaceted therapeutic target in cardiovascular disease." J Cardiovasc Transl Res **3**(5): 525-537.
- Rosenbaum, T., A. Gordon-Shaag, et al. (2004). "Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin." J Gen Physiol **123**(1): 53-62.
- Runnels, L. W., L. Yue, et al. (2001). "TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities." Science **291**(5506): 1043-1047.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.

- Santamaria-Kisiel, L., A. C. Rintala-Dempsey, et al. (2006). "Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family." Biochem J **396**(2): 201-214.
- Santella, L. and E. Carafoli (1997). "Calcium signaling in the cell nucleus." FASEB J **11**(13): 1091-1109.
- Satoh, S., H. Tanaka, et al. (2007). "Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca²⁺ channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis." Mol Cell Biochem **294**(1-2): 205-215.
- Shi, J., N. Geshi, et al. (2013). "Molecular determinants for cardiovascular TRPC6 channel regulation by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II." J Physiol **591**(Pt 11): 2851-2866.
- Shi, J., E. Mori, et al. (2004). "Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells." J Physiol **561**(Pt 2): 415-432.
- Schafer, B. W., J. M. Fritschy, et al. (2000). "Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily." J Biol Chem **275**(39): 30623-30630.
- Singh, B. B., X. Liu, et al. (2002). "Calmodulin regulates Ca(2+)-dependent feedback inhibition of store-operated Ca(2+) influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1." Mol Cell **9**(4): 739-750.
- Sinkins, W. G., M. Goel, et al. (2004). "Association of immunophilins with mammalian TRPC channels." J Biol Chem **279**(33): 34521-34529.
- Soboloff, J., M. Spassova, et al. (2005). "Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells." J Biol Chem **280**(48): 39786-39794.
- Sours-Brothers, S., M. Ding, et al. (2009). "Interaction between TRPC1/TRPC4 assembly and STIM1 contributes to store-operated Ca²⁺ entry in mesangial cells." Exp Biol Med (Maywood) **234**(6): 673-682.
- Storch, U., A. L. Forst, et al. (2012). "Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes." J Biol Chem **287**(5): 3530-3540.
- Strubing, C., G. Krapivinsky, et al. (2001). "TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain." Neuron **29**(3): 645-655.
- Strubing, C., G. Krapivinsky, et al. (2003). "Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain." J Biol Chem **278**(40): 39014-39019.
- Su, Z., M. A. Blazing, et al. (1995). "The calmodulin-nitric oxide synthase interaction. Critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation." J Biol Chem **270**(49): 29117-29122.
- Swindells, M. B. and M. Ikura Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs, Nat Struct Biol. 1996 Jun;3(6):501-4.
- Tang, J., Y. Lin, et al. (2001). "Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels." J Biol Chem **276**(24): 21303-21310.
- Tang, Y., J. Tang, et al. (2000). "Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF." J Biol Chem **275**(48): 37559-37564.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.
- Tiruppathi, C., G. U. Ahmmed, et al. (2006). "Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability." Microcirculation **13**(8): 693-708.
- Tong, Q., X. Chu, et al. (2004). "Erythropoietin-modulated calcium influx through TRPC2 is mediated by phospholipase Cgamma and IP3R." Am J Physiol Cell Physiol **287**(6): 25.
- Toutenhoofd, S. L. and E. E. Strehler (2000). "The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools?" Cell Calcium **28**(2): 83-96.
- Trebak, M., N. Hempel, et al. (2005). "Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712." Mol Pharmacol **67**(2): 558-563.
- Trebak, M., J. B. G. St, et al. (2003). "Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels." J Biol Chem **278**(18): 16244-16252.
- Treves, S., E. Scutari, et al. (1997). "Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle." Biochemistry **36**(38): 11496-11503.
- Trost, C., C. Bergs, et al. (2001). "The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins." Biochem J **355**(Pt 3): 663-670.
- Trost, C., A. Marquart, et al. (1999). "Ca²⁺-dependent interaction of the trpl cation channel and calmodulin." FEBS Lett **451**(3): 257-263.
- Tsvilovskyy, V. V., A. V. Zholos, et al. (2009). "Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo." Gastroenterology **137**(4): 1415-1424.
- Valeur, B. (2001). Fluorescence Polarization. Emission Anisotropy. Molecular Fluorescence, Wiley-VCH Verlag GmbH: 125-154.
- Valeur, B. (2001). Principles of Steady-State and Time-Resolved Fluorometric Techniques. Molecular Fluorescence, Wiley-VCH Verlag GmbH: 155-199.
- van de Graaf, S. F., J. G. Hoenderop, et al. (2003). "Functional expression of the epithelial Ca²⁺ channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex." EMBO J **22**(7): 1478-1487.
- van de Graaf, S. F. J., J. G. J. Hoenderop, et al. (2003). "Functional expression of the epithelial Ca²⁺ channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex." EMBO J **22**(7): 1478-1487.
- Vannier, B., X. Zhu, et al. (1998). "The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry." J Biol Chem **273**(15): 8675-8679.
- Vazquez, G., B. J. Wedel, et al. (2004). "The mammalian TRPC cation channels." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 21-36.
- Venkatachalam, K., D. B. van Rossum, et al. (2002). "The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry." Nat Cell Biol **4**(11): E263-272.
- Voets, T., K. Talavera, et al. (2005). "Sensing with TRP channels." Nat Chem Biol **1**(2): 85-92.
- Volkers, M., D. Rohde, et al. (2010). "S100A1: a regulator of striated muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling, sarcomeric, and mitochondrial function." J Biomed Biotechnol **2010**: 178614.

- Warr, C. G. and L. E. Kelly (1996). "Identification and characterization of two distinct calmodulin-binding sites in the Trp1 ion-channel protein of *Drosophila melanogaster*." Biochem J **314** (Pt 2): 497-503.
- Wedel, B. J., G. Vazquez, et al. (2003). "A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP3 receptor-independent process." J Biol Chem **278**(28): 25758-25765.
- Wes, P. D., J. Chevesich, et al. (1995). "TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9652-9656.
- Wheeler, G. L. and C. Brownlee (2008). "Ca²⁺ signalling in plants and green algae--changing channels." Trends Plant Sci **13**(9): 506-514.
- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2008). "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases." Biopolymers **89**(5): 392-400.
- Worley, P. F., W. Zeng, et al. (2007). "TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels." Cell Calcium **42**(2): 205-211.
- Wriggers, W., E. Mehler, et al. (1998). "Structure and dynamics of calmodulin in solution." Biophys J **74**(4): 1622-1639.
- Wright, N. T., B. L. Prosser, et al. (2008). "S100A1 and calmodulin compete for the same binding site on ryanodine receptor." J Biol Chem **283**(39): 26676-26683.
- Wu, L. J., T. B. Sweet, et al. (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family." Pharmacol Rev **62**(3): 381-404.
- Xi, Q., A. Adebisi, et al. (2008). "IP3 constricts cerebral arteries via IP3 receptor-mediated TRPC3 channel activation and independently of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release." Circ Res **102**(9): 1118-1126.
- Yamada, M., A. Miyawaki, et al. (1995). "The calmodulin-binding domain in the mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor." Biochem J **308** (Pt 1): 83-88.
- Yap, K. L., J. Kim, et al. (2000). "Calmodulin target database." J Struct Funct Genomics **1**(1): 8-14.
- Yildirim, E. and L. Birnbaumer (2007). "TRPC2: molecular biology and functional importance." Handb Exp Pharmacol(179): 53-75.
- Yu, P. C., S. Y. Gu, et al. (2010). "TRPC1 is essential for in vivo angiogenesis in zebrafish." Circ Res **106**(7): 1221-1232.
- Yuan, J. P., K. Kiselyov, et al. (2003). "Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors." Cell **114**(6): 777-789.
- Yuan, J. P., W. Zeng, et al. (2007). "STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels." Nat Cell Biol **9**(6): 636-645.
- Yuan, T. and H. J. Vogel (1998). "Calcium-calmodulin-induced dimerization of the carboxyl-terminal domain from petunia glutamate decarboxylase. A novel calmodulin-peptide interaction motif." J Biol Chem **273**(46): 30328-30335.
- Zechel, S., S. Werner, et al. (2007). "Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain." Cell Tissue Res **328**(3): 651-656.
- Zhang, Z., V. Majava, et al. (2009). "Collapsin response mediator protein-2 is a calmodulin-binding protein." Cell Mol Life Sci **66**(3): 526-536.
- Zhang, Z., J. Tang, et al. (2001). "Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3168-3173.

- Zhou, X., Z. Su, et al. (2007). "Yeast screens show aromatic residues at the end of the sixth helix anchor transient receptor potential channel gate." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15555-15559.
- Zhu, M. H., M. Chae, et al. (2005). "Desensitization of canonical transient receptor potential channel 5 by protein kinase C." Am J Physiol Cell Physiol **289**(3): C591-600.
- Zhu, M. X. (2005). "Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels." Pflugers Arch **451**(1): 105-115.
- Zitt, C., A. Zobel, et al. (1996). "Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion." Neuron **16**(6): 1189-1196.

7 PŘÍLOHY

7.1 Publikační činnost

Characterization of the S100A1 protein binding site on TRPC6 C-terminus.

Bily J, Grycova L, Holendova B, Jirku M, Janouskova H, Bousova K, Teisinger J. PLoSOne. 2013 May 3;8(5):e62677. doi: 10.1371/journal.pone.0062677. Print 2013.

Integrative binding sites within intracellular termini of TRPV1 receptor.

Grycova L, Holendova B, Bumba L, **Bily J**, Jirku M, Lansky Z, Teisinger J. PLoSOne. 2012;7(10):e48437. doi: 10.1371/journal.pone.0048437. Epub 2012 Oct 31.

Characterization of calmodulin binding domains in TRPV2 and TRPV5 C-tails.

Holakovska B, Grycova L, **Bily J**, Teisinger J. AminoAcids. 2011 Feb;40(2):741-8. doi: 10.1007/s00726-010-02-2. Epub 2010 Aug 5.

7.2 Prvoautorská publikace

Characterization of the S100A1 Protein Binding Site on TRPC6 C-Terminus

Jan Bily, Lenka Grycova, Blanka Holendova, Michaela Jirku, Hana Janouskova, Kristyna Bousova, Jan Teisinger*

Department of Protein Structures, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Abstract

The transient receptor potential (TRP) protein superfamily consists of seven major groups, among them the “canonical TRP” family. The TRPC proteins are calcium-permeable nonselective cation channels activated after the emptying of intracellular calcium stores and appear to be gated by various types of messengers. The TRPC6 channel has been shown to be expressed in various tissues and cells, where it modulates the calcium level in response to external signals. Calcium binding proteins such as Calmodulin or the family of S100A proteins are regulators of TRPC channels. Here we characterized the overlapping integrative binding site for S100A1 at the C-tail of TRPC6, which is also able to accommodate various ligands such as Calmodulin and phosphatidyl-inositol-(4,5)-bisphosphate. Several positively charged amino acid residues (Arg852, Lys856, Lys859, Arg860 and Arg864) were determined by fluorescence anisotropy measurements for their participation in the calcium-dependent binding of S100A1 to the C terminus of TRPC6. The triple mutation Arg852/Lys859/Arg860 exhibited significant disruption of the binding of S100A1 to TRPC6. This indicates a unique involvement of these three basic residues in the integrative overlapping binding site for S100A1 on the C tail of TRPC6.

Citation: Bily J, Grycova L, Holendova B, Jirku M, Janouskova H, et al. (2013) Characterization of the S100A1 Protein Binding Site on TRPC6 C-Terminus. PLoS ONE 8(5): e62677. doi:10.1371/journal.pone.0062677

Editor: Mark J. van Raaij, Centro Nacional de Biotecnología - CSIC, Spain

Received: January 21, 2013; **Accepted:** March 24, 2013; **Published:** May 3, 2013

Copyright: © 2013 Bily et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grant 301/10/1159 of the Grant Agency of the Czech Republic, grant P205/10/P308 of the Grant Agency of the Czech Republic and from institutional project of the Institute of Physiology (RVO: 67985823) and institutional project of the Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO: 61388971). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: teisingr@biomed.cas.cz

Introduction

TRPC6 is a member of a large group of transient receptor potential (TRP) channels, a diverse group of cation-permeable channels. This family includes more than 30 proteins that play critical roles in various biological processes [1]. They are widely expressed in the nervous system and non-excitabile cells. TRP channels are involved in many physiological processes, they are important regulators of cation homeostasis in cells and many of them serve as biological sensors for the detection of various environmental stimuli [2]. TRP channels can be divided into seven subfamilies (C - canonical, V - vanilloid, M - melastatin, ML - mucolipin, P - polycystin, A – ankyrin, N – no mechanoreceptor potential C) on the basis of sequence homology [3]. TRP channels contain six putative transmembrane domains, a pore region between domain 5 and 6, and amino- and carboxy- intracellular termini [3,4]. Many conserved domains have been identified within the intracellular termini, and they serve as important interaction sites for various regulatory molecules [2].

Members of the TRPC subfamily (TRPC1-TRPC7) typically contain 3–4 ankyrin repeats on their N-terminus and a conserved region called TRP box at the C-terminus, also present in TRPVs and TRPMs. These channels are non-selectively permeable to cations, nevertheless their selectivity for calcium over sodium varies among their members. It has been proposed that TRPC channels can be activated by the stimulation of phospholipase C, but a number of different modulators such as signaling proteins,

cytoskeletal elements, scaffold molecules and also other ion channels have been reported to modulate their activity. All TRPC channels have been described as store-operated channels (SOCs), that are activated when intracellular Ca^{2+} stores become depleted [5].

TRPC6 was reported to be modulated by Ca^{2+} ions together with calmodulin (CaM) [6,7,8]. The CaM binding region on the C-terminus was described in detail [6,8]. The domain contains several consensus CaM binding motifs with hydrophobic residues in specific positions and was also shown to interact with the IP3 receptor (IP3R) and described as the so-called CaM and IP3R binding domain (CIRB) conserved among all TRPC members [6].

S100A proteins are a large family of calcium-binding proteins found in *Vertebrates*. It was assumed that these proteins simply function as cellular calcium buffers, but they have been later reported to take part in the regulation of many cellular processes [9].

S100A1 is a small dimeric protein that is highly expressed in cardiomyocytes, and also in fast and slow twitch muscles, brain and hippocampal neurons [10]. It contains two EF-hand motifs that are able to bind Ca^{2+} ions, causing a conformational change by moving one helix and exposing a broad hydrophobic surface that enables the protein to interact with a variety of target proteins and ion channels [11,12]. In contrast to CaM, the first EF hand motif binds Ca^{2+} with a lower affinity than the second EF hand [13,14].

The TRPC6 channel modulates the calcium levels in eukaryotic cells, including sensory receptor cells in response to external signals. Its activity is modulated by multiple factors. It was recently shown that CaM, a Ca²⁺ binding protein, acts as an important mediator of Ca²⁺-dependent regulation [6,8] and the interaction site was characterized [7,8]. S100A1 behaves similarly in terms of mediating the activity of other ion channels [15,16]. For this reason we tested the binding of the S100A1 protein to TRPC6 C-terminus (CT) (801–878), which interacts directly with CaM [7,8]. Using site-directed mutagenesis of the predicted basic amino acid residues of TRPC6 CT combined with steady-state fluorescence anisotropy measurements, we found that the S100A1 protein is able to bind to the TRPC6 C-terminus. Moreover, this binding site overlaps with the previously reported CIRB binding site on the same receptor.

Materials and Methods

TRPC6 Cloning, Expression and Purification

The coding region for the C-terminal part of rat TRPC6 (amino acids 801–878) was cloned into the pET42b expression vector (Novagen). Point mutations of several basic amino acids, namely Arg852, Arg864, Lys 856 and Ile 857, as well as the triple substitutions Arg852/Lys859/Arg860 and Lys859/Arg860/Arg864 were performed by site-directed mutagenesis according to the manufacturer's protocol (Stratagene). All the constructs were confirmed by DNA sequencing.

The proteins were expressed as fusion proteins with a His-tag on their C-termini in *E. coli* Rosetta cells (Novagen). The expression of the proteins was induced by 0.5 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside for 16 hours at 20°C. The proteins were purified by Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Gel permeation chromatography on Superdex 75 (Amersham Biosciences) was used as a final purification step. A 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 500 mM NaCl and 2 mM CaCl₂ was used for the elution. The protein samples were concentrated using spin columns (Millipore) and the purity was verified by 15% SDS-PAGE (Fig. S1). The concentration of the constructs was estimated by measuring absorbance at 280 nm. The integrity of the proteins was verified by MS-MS analysis. The expression and purification of the (His)₆-tagged proteins was described in detail previously [17].

S100A1 Protein Cloning, Expression, Purification and Labeling

cDNA coding for human S100A1 was cloned into the pET28b expression vector (Novagen). The protein was expressed in *E. coli* BL21 cells. Its expression was induced by 0.5 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside for 12 hours at 25°C. The protein was purified using Phenyl Sepharose CL4B (Amersham Biosciences) equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂. Bound S100A1 was eluted with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1.5 mM EDTA and concentrated using a spin column for protein concentration (Millipore). Concentrated protein solution was loaded into a Superdex 75 column (Amersham Pharmacia Biotech) and eluted with 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ as a final purification step. The purity of the protein was verified by 15% SDS-PAGE (Fig. S2). The concentration of the protein was assessed by BCA's assay using BSA as a standard protein [18].

The S100A1 protein was then dialyzed against 10 mM NaHCO₃ buffer (pH 10.0) and 100 mM NaCl for 8 hours at 4°C. The protein sample was mixed with 0.6 dansyl chloride

(DNS) solution (Sigma) in a molar ratio of 1:1.5 and incubated at 4°C for 12 h. The sample was dialyzed for 8 hours against 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 2 mM EDTA to remove the free DNS-chloride and then against the same buffer containing 2 mM CaCl₂ instead of EDTA at 4°C overnight [19]. The incorporation stoichiometry was determined by comparing the peak protein absorbance at 280 nm with the absorbance of the bound DNS measured at 340 nm, using an extinction coefficient of 4,300 m⁻¹ cm⁻¹ T [20].

Steady-state Fluorescence Anisotropy Measurements

Steady-state fluorescence anisotropy measurements were used as a binding assay to determine the binding affinity between fluorescently labeled S100A1 protein and the C-terminal part of TRPC6 and its mutants. The experiment was performed using an ISS PC1TM photon-counting spectrofluorimeter. The monochromator excitation and emission wavelengths were set to 340 nm and 520 nm for all measurements. The fraction of bound TRPC6 protein (F_B) was calculated from the equation 1:

$$F_B = \frac{(r_{\text{obs}} - r_{\text{min}})}{(r_{\text{max}} - r_{\text{obs}})Q + (r_{\text{obs}} - r_{\text{min}})}$$

where r_{obs} is the observed anisotropy for any TRPC6 protein concentration, r_{max} is the anisotropy at saturation and r_{min} is the minimum observed anisotropy for the free DNS-S100A1. The parameter Q represents the quantum yield ratio of the bound to the free form, and was estimated by calculating the ratio of the intensities of the bound to the free fluorophore. To determine the equilibrium dissociation constant (K_D), the values of the bound fraction of the protein were plotted against the TRPC6 protein concentration and fitted using the equation 2:

$$F_B = \frac{K_D + [P_1] + [P_2] - \sqrt{(K_D + [P_1] + [P_2])^2 - 4[P_1][P_2]}}{2[P_1]}$$

where K_D is the equilibrium dissociation constant, $[P_1]$ is the DNS-S100A1 concentration, and $[P_2]$ is the concentration of the TRPC6 protein. Non-linear data fitting was performed using the program SigmaPlot10 [17]. All experiments were carried out in at least triplicate.

Mass Spectrometric Analysis

The excised protein band from SDS-PAGE, TRPC6, was digested with trypsin endoprotease (Promega) directly in the gel after destaining and cysteine modification by iodoacetamide [21]. The resulting peptide mixture was extracted, loaded onto the MALDI-TOF target with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix, and positively charged spectra or MS/MS were acquired using an UltraFLEX III mass spectrometer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) with internal calibration (monoisotopic $[M+H]^+$ ions of the TRPC6 peptides with known sequences).

Circular Dichroism Spectroscopy

Circular dichroism (CD) experiments were carried out in a Jasco J-815 spectrometer (Tokyo, Japan). The protein concentration was kept constant for all measured samples and was 0.35 mg/ml. The spectra were collected from 200 to 300 nm using a 0.1 cm quartz cell at room temperature. A 0.5 nm step resolution, 20 nm/min speed, 8 s response time and 1 nm bandwidth were used. After baseline correction, the final spectra were expressed as a molar

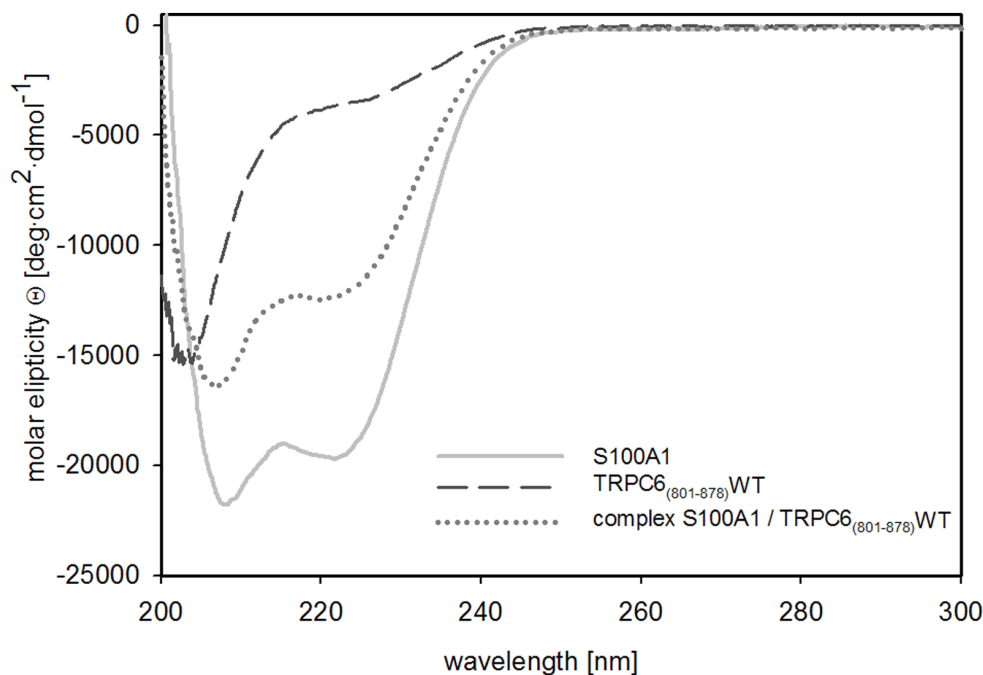


Figure 1. Circular dichroism spectroscopy measurement of TRPC6_(801–878)WT, S100A1 and the complex of S100A1 and TRPC6_(801–878)WT. Examples of CD spectra of TRPC6_(801–878)WT, S100A1 and the complex of S100A1 and TRPC6_(801–878)WT expressed as a molar ellipticity Q (deg·cm²·dmol⁻¹) per residue.

doi:10.1371/journal.pone.0062677.g001

ellipticity Q (deg·cm²·dmol⁻¹) per residue. Secondary structure content was estimated using Dichroweb software [22].

Results and Discussion

TRPC6 and S100A1 Expression and Purification

The TRPC6 C-terminal protein construct (801–878) and its mutants were expressed as fusion proteins with a 6x His-tag on their C-termini in *E. coli* Rosetta cells. The S100A1 protein was expressed in *E. coli* BL21 cells. All proteins were purified by a two-step purification process. The proteins were soluble and in sufficient amount to perform the binding experiments (Fig. S1 and S2). The integrity of the proteins was verified by circular dichroism spectroscopy measurement. Numerical analysis of the experimental spectra enabled estimation of the relative abundance of the various secondary structure elements. (Fig. 1, Tab. 1). The α -helical conformation (66%) was found to be the major component of the S100A1 protein, which is in good agreement with the conformation found in its native state. The structure of the TRPC6 C-terminus is unknown. According to the theoretical

prediction of the secondary structural elements using computational tools, the region was predicted to be mostly unordered. The CD spectra analysis confirmed the theoretical prediction, suggesting that the TRPC6 protein construct was adopting its native form. The experiment was also used to observe changes in the secondary structural elements during the creation of the TRPC6/S100A1 complex (Fig 1, Tab 1). We compared the CD spectrum of the complex with the CD spectra of the proteins alone. Because the CD spectra of the mixture are the sum of the TRPC6 protein construct and S100A1 individually, we suggest that the changes in the secondary structure of TRPC6 (801–878) have no significant effect on its binding to S100A1.

S100A1 Binds to TRPC6 (801–878) C-terminus

S100 protein family is known to act as calcium-signaling molecules by converting changes in cellular calcium levels to a variety of biological responses. In this manner, many of the S100 proteins have been shown to modulate enzyme activities, oligomerization of cytoskeletal protein components (tubulin, desmin, glial fibrillary acidic protein), modulate ubiquitination,

Table 1. Calculated incidence (%) of secondary structures of S100A1 and TRPC6_(801–878) WT and TRPC6 single mutant R852A and complex of TRPC6_(801–878) WT/S100A1.

Protein	Helix	Antiparallel	Parallel	Beta Turn	Random Coil
TRPC6 _(801–878) WT	0,18	0,15	0,12	0,20	0,36
TRPC6 _(801–878) R852A	0,22	0,14	0,11	0,20	0,34
S100A1	0,66	0,03	0,03	0,12	0,15
S100A1+ TRPC6 _(801–878) WT	0,43	0,07	0,07	0,17	0,25

doi:10.1371/journal.pone.0062677.t001

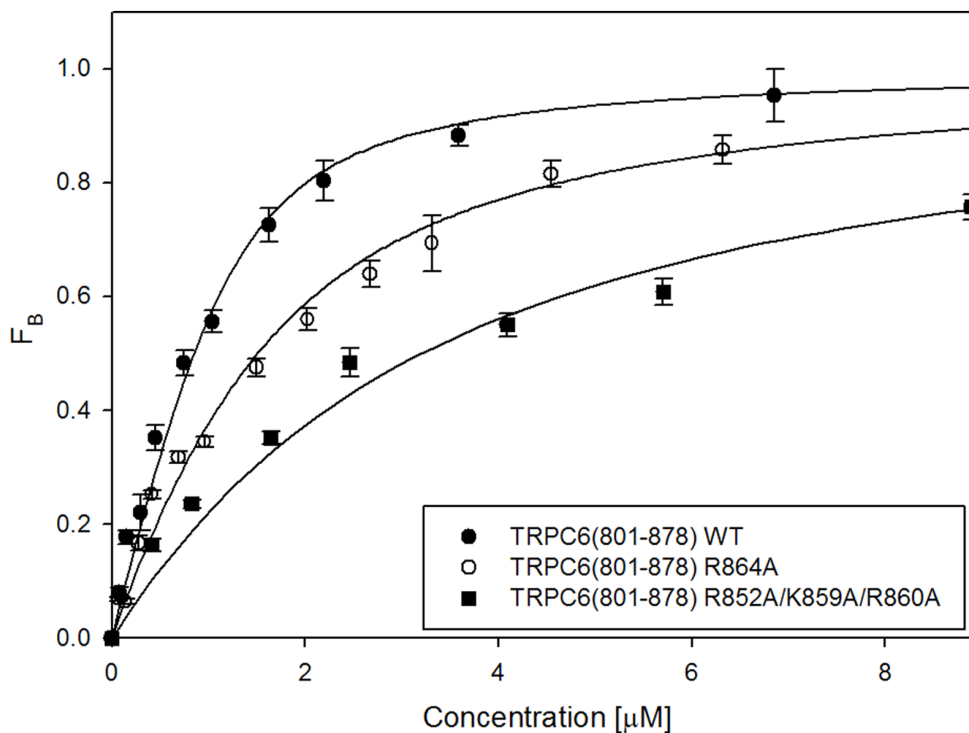


Figure 2. Steady-state fluorescence anisotropy measurement of TRPC6₍₈₀₁₋₈₇₈₎ WT and selected mutants to fluorescently labeled S100A1 protein. DNS- S100A1 protein (232 μ M) was titrated with TRPC6 fusion protein and the F_B was calculated using equation 1 as was described in material and methods. Binding isotherms and dissociation constants were calculated by fitting the data to the equation 2 as was described in material and methods. Values are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) measured from at least from three independent experiments. Binding isotherms of wild-type TRPC6₍₈₀₁₋₈₇₈₎ is represented as black circles, single mutant is TRPC6₍₈₀₁₋₈₇₈₎ R864A as white circles and triple mutant TRPC6₍₈₀₁₋₈₇₈₎ K859A/R860A/R864A as black squares.
doi:10.1371/journal.pone.0062677.g002

control membrane vesicle formation and participate in trafficking of proteins to the inner surface of the plasma membrane [11]. The interaction between the transient receptor potential cation channel proteins TRPV5 and TRPV6 with S100A10 has been shown using two-hybrid and co-immunoprecipitation experiments [23,24]. In this role, the S100A10-annexin A2 complex is thought to mediate trafficking of the TRV5 and TRV6 proteins to the plasma membrane where they act as calcium-selective channels. Recently our research group has also shown a direct interaction between S100A1 protein and TRPM3 ion channel, where this protein was able to compete with CaM for the overlapping binding site [25].

The protein samples were used for steady-state fluorescence anisotropy measurement to characterize the binding ability of the S100A1 protein to TRPC6 C-terminal region 801–878. Increasing amounts of the TRPC6 protein construct were titrated into the DNS-S100A1 solution. The equilibrium dissociation constant of the TRPC6₍₈₀₁₋₈₇₈₎/Ca²⁺-S100A1 complex was estimated to be 0.31 \pm 0.04 μ M (Fig. 2). The value of the equilibrium dissoci-

ation constant is nearly the same as was estimated for CaM binding to be 0.320 \pm 0.019 μ M [8]. As the amino acid residues important for CaM binding are known (Fig. 3), we tested their role in S100A1 binding (Fig. 2). The single substitution of R852A and triple substitution of K859A/R860A/R864A had almost no effect on its binding. (Fig. 2, Tab. 2). Interestingly, in comparison to the CaM binding, where the neutralization of this residue had the most striking effect [8], the R852 residue did not influence the interaction with S100A1 at all. Although the TRPC6 WT binding affinities to both ligands CaM and S100A1 are almost the same, according to the results we obtained it seems that different residues are involved in the binding. The mutations of K856A and R864A

NKRNEEKKFG IGS SHEDLSK FSLDKNQLAH NKQSSTRSSE

DYHLNSFSNP **P**R**Q**Y**Q****K****I**M**K**R **L**I**K****R**Y**L**Q**A**Q IDKESDEV

Figure 3. Amino acid sequence of TRPC6 fusion protein. Native rat TRPC6 801–878 amino acid sequence containing integrative binding site was investigated. Predicted important basic amino acids that were replaced by alanine are in red.

doi:10.1371/journal.pone.0062677.g003

Table 2. Summary of estimated equilibrium dissociation constants of the complex of TRPC6₍₈₀₁₋₈₇₈₎WT and its mutants with S100A1.

Protein	K _D , μ M
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ WT	0.31 \pm 0.04
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ R852A	0.48 \pm 0.11
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ K856A	0.76 \pm 0.09
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ R864A	0.92 \pm 0.08
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ R852A/K859A/R860A	2.62 \pm 0.22
TRPC6 ₍₈₀₁₋₈₇₈₎ K859A/R860A/R864A	0.40 \pm 0.05

doi:10.1371/journal.pone.0062677.t002

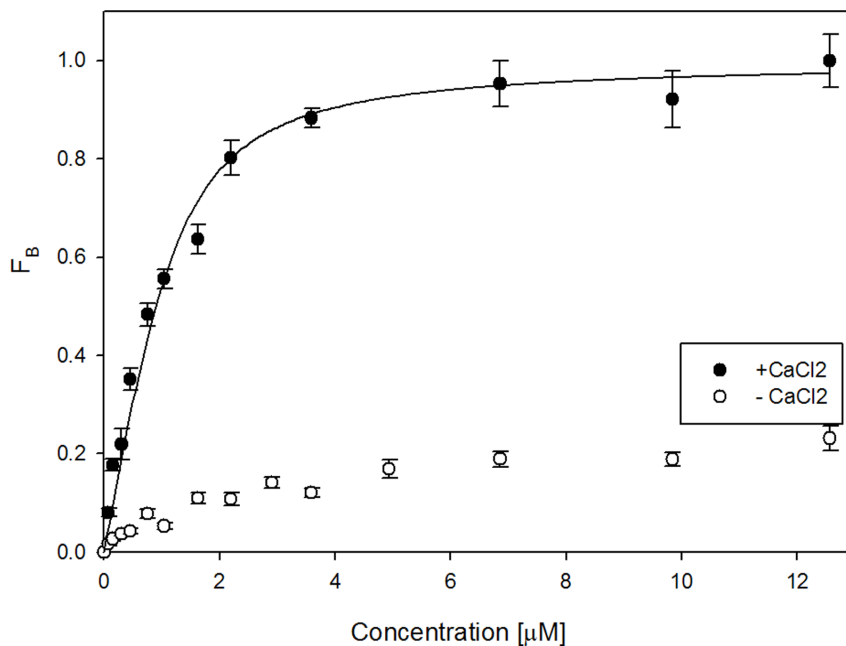


Figure 4. Steady-state fluorescence anisotropy measurement of interaction between TRPC6^(801–878) WT and DNS-S100A1 protein in presence and absence of calcium ions. Titration of DNS-S100A1 protein (232 µM) with TRPC6 fusion protein in presence of calcium ions resulted in an increase of bound fraction (F_b) (white dots) compared to when the DNS-S100A1 protein was titrated with TRPC6 fusion protein in absence of calcium ions (black dots). Values are expressed as the mean ± standard deviation (SD) measured from at least three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0062677.g004

lead to an up to 3-fold decrease in the binding affinity to S100A1. These results are in a good agreement with TRPC6/CaM binding data. The R852A/K859A/R860A triple mutation caused the most significant decrease in binding ability (Tab. 2).

Binding of TRPC6 801–878 to S100A1 is Calcium-dependent

Since S100A1 is a Ca²⁺-binding protein and Ca²⁺ ions play a crucial role in TRPC6 activity regulation, the role of calcium ions in S100A1 binding to TRPC6 (801–878) was assessed. The experiment was performed in a solution without calcium. There was no increase in fluorescence anisotropy when calcium was absent (Fig. 4), suggesting that the binding is calcium-dependent. The same behavior has been detected for the CaM/TRPC6-CT (801–878) interaction [8].

In this report the interaction of the Ca²⁺-binding protein S100A1 with the conserved region (801–878) of the TRPC6-CT was investigated. We found that these proteins bind with high affinity and the binding is Ca²⁺-dependent, analogous to that of CaM. According to our results, the interaction is similar but not exactly the same, because different residues are essential for the interaction. Here we show the role of some basic amino acid residues from the so-called CIRB region of TRPC6 affecting its binding to S100A1. These results could suggest potential physiological consequences which will need further investigation.

References

- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. Annual Review of Physiology 68: 619–647.
- Minke B (2006) TRP channels and Ca²⁺ signaling. Cell Calcium 40: 261–275.
- Pedersen S, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: An overview. Cell Calcium 38: 233–252.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. Nature Reviews Neuroscience 2: 387–396.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. Physiological Reviews 87: 165–217.
- Zhu MX (2005) Multiple roles of calmodulin and other Ca²⁺-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. Pflugers Arch 451: 105–115.
- Kwon Y, Hofmann T, Montell C (2007) Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. Molecular Cell 25: 491–503.

Supporting Information

Figure S2 Final purification step of the S100A1 protein.

Chromatogram and SDS-PAGE of fractions 1–6 after gel chromatography on Sephadex 75.

(DOCX)

Figure S1 Final purification step of the protein construct TRPC6 (801–878).

Chromatogram and SDS-PAGE of fractions 1–9 after the gel chromatography on Sephadex 75.

(DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. L. Bednarova from the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic for her assistance with CD spectra measurements.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JB LG BH MJ HJ KB JT. Performed the experiments: JB LG BH MJ HJ KB JT. Analyzed the data: JB LG BH MJ HJ KB JT. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB LG BH MJ HJ KB JT. Wrote the paper: JB LG BH JT.

8. Friedlova E, Grycova L, Holakovska B, Silhan J, Janouskova H, et al. (2010) The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin. *Neurochemistry International* 56: 363–366.
9. Wright NT, Cannon BR, Zimmer DB, Weber DJ (2009) S100A1: Structure, Function, and Therapeutic Potential. *Curr Chem Biol* 3: 138–145.
10. Zimmer DB, Chaplin J, Baldwin A, Rast M (2005) S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51: 201–214.
11. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS (2006) Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochemical Journal* 396: 201–214.
12. Zimmer DB, Landar A (1995) Analysis of S100A1 expression during skeletal muscle and neuronal cell differentiation. *J Neurochem* 64: 2727–2736.
13. Rustandi RR, Baldissari DM, Inman KG, Nizner P, Hamilton SM, et al. (2001) Three-Dimensional Solution Structure of the Calcium-Signaling Protein Apo-S100A1 As Determined by NMR†,‡. *Biochemistry* 41: 788–796.
14. Wright NT, Varney KM, Ellis KC, Markowitz J, Gitti RK, et al. (2005) The Three-dimensional Solution Structure of Ca²⁺-bound S100A1 as Determined by NMR Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 353: 410–426.
15. Wright NT, Prosser BL, Varney KM, Zimmer DB, Schneider MF, et al. (2008) S100A1 and calmodulin compete for the same binding site on ryanodine receptor. *J Biol Chem* 283: 26676–26683.
16. Treves S, Scutari E, Robert M, Groh S, Ottolia M, et al. (1997) Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Skeletal Muscle†. *Biochemistry* 36: 11496–11503.
17. Grycova L, Lansky Z, Friedlova E, Obsilova V, Janouskova H, et al. (2008) Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375: 680–683.
18. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76–85.
19. Kincaid RL, Vaughan M, Osborne JC, Tkachuk VA (1982) Ca²⁺-dependent interaction of 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl-calmodulin with cyclic nucleotide phosphodiesterase, calcineurin, and troponin I. *Journal of Biological Chemistry* 257: 10638–10643.
20. Johnson JD, Collins JH, Potter JD (1978) Dansylaziridine-labeled troponin C. A fluorescent probe of Ca²⁺ binding to the Ca²⁺-specific regulatory sites. *Journal of Biological Chemistry* 253: 6451–6458.
21. Prochazkova K, Osicka R, Linhartova I, Halada P, Sulc M, et al. (2005) The *Neisseria meningitidis* outer membrane lipoprotein FrpD binds the RTX protein FrpC. *J Biol Chem* 280: 3251–3258.
22. Holakovska B, Grycova L, Bily J, Teisinger J (2011) Characterization of calmodulin binding domains in TRPV2 and TRPV5 C-tails. *Amino Acids* 40: 741–748.
23. Borthwick LA, Neal A, Hobson L, Gerke V, Robson L, et al. (2008) The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia. *Cell Calcium* 44: 147–157.
24. van de Graaf SFJ, Hoenderop JGJ, Gkika D, Lamers D, Prenen J, et al. (2003) Functional expression of the epithelial Ca²⁺ channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J* 22: 1478–1487.
25. Holakovska B, Grycova L, Jirku M, Sulc M, Bumba L, et al. (2012) Calmodulin and S100A1 Protein Interact with N Terminus of TRPM3 Channel. *Journal of Biological Chemistry* 287: 16645–16655.