

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Jana Vašková**

**Funkční úloha cytoplazmatických konců  
ankyrinového receptoru TRPA1**

**Functional role of cytoplasmic terminal domains  
of TRPA1 channel**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Oddělení buněčné neurofyziologie

Fyziologický ústav AV ČR

Praha 2015

## **Prohlášení**

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

V Praze 30. 4. 2015

.....

Jana Vašková

## Poděkování

Děkuji především vedoucí této diplomové práce, RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc. za cenné rady a připomínky, zvláště potom za ochotu a trpělivost, které se mi dostávalo po celou dobu vytváření této práce. Velký dík patří také Mgr. Aničce Hynkové, které vděčím za úvod do laboratorních metod, věcné poznámky, laskavost a mnoho trpělivosti. Děkuji také všem kolegům z oddělení buněčné neurofyzologie za vytváření příjemného pracovního prostředí.

## Abstrakt

Receptor TRPA1 je převážně exprimován na primárních aferentních senzoričských neuronech, kde může být aktivován širokým spektrem štiplavých a reaktivních sloučenin, jakými jsou například allyl isothiokyanát nebo cinnamaldehyd. Tyto látky aktivují TRPA1 prostřednictvím kovalentní modifikace cysteinů z cytoplazmatické strany, odkud může být kanál zároveň modulován vnitrobuněčnými vápenatými ionty. Významnou roli v těchto procesech hrají aminové (N-) a karboxylové (C-) konce receptoru. Předkládaná diplomová práce přináší nové poznatky o úloze specifických cytoplazmatických domén v aktivaci TRPA1 receptoru, jež byla studována pomocí elektrofyziologických a molekulárně biologických metod. Měření membránových proudů TRPA1, vyvolaných chemicky, napětím a vápenatými ionty, byla nalezena vysoce konzervovaná serinová a threoninová rezidua v rámci N-koncové ankyrinové domény, jejichž mutacemi byly silně ovlivněny odpovědi kanálu. Zároveň bylo nově zjištěno, že distální karboxylový konec, o němž bylo již dříve známo, že se podílí na regulaci receptoru vápenatými ionty, přispívá k napětově závislé aktivaci TRPA1 receptoru.

**Klíčová slova:** Ankyrinový receptor; přechodný receptorový potenciál; iontový kanál; nocicepce; senzoričský neuron; struktura-funkce; bodová mutace

## **Abstract**

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channel is expressed in a subset of primary afferent neurones where it is activated by a variety of pungent and chemically reactive compounds such as allyl isothiocyanate or cinnamaldehyde. This voltage-dependent channel is activated through covalent modification of cytoplasmic cysteines and, from the cytoplasmic side, is also critically regulated by calcium ions. Both, amino (N-) and carboxyl (C-) termini have been shown to be involved in these processes. Using electrophysiological and molecular-biology techniques, we explored the role of specific cytoplasmic domains in the activation of TRPA1. By measuring chemically-, voltage-, and calcium-activated membrane TRPA1-mediated currents, we identified highly conserved serine and threonine residues along the N-terminal ankyrin repeat domain, mutation of which strongly affected responses of the channel. In addition, using C-terminally truncated construct previously reported to be involved in calcium regulation, we present a new finding that the distal C-terminal tail contributes to voltage-dependent activation of TRPA1.

**Key words:** Ankyrin receptor; transient receptor potential; ion channel; nociception; sensory neuron; structure-function; point mutation

# 1 OBSAH

<b>1</b>	<b>OBSAH</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>13</b>
4.1	FYZIOLOGICKÁ ÚLOHA TRPA1 RECEPTORU .....	13
4.1.1	<i>Senzitizace TRPA1 heterologními buněčnými drahami</i> .....	14
4.1.2	<i>Heterologní a homologní desenzitizace TRPA1</i> .....	15
4.2	STRUKTURÁLNÍ VLASTNOSTI TRPA1 RECEPTORU .....	16
4.2.1	<i>Transmembránová oblast TRPA1</i> .....	18
4.2.2	<i>N-koncová část TRPA1</i> .....	18
4.2.3	<i>C-koncová část TRPA1</i> .....	21
4.3	FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI TRPA1 RECEPTORU .....	22
4.3.1	<i>Kovalentní modifikace</i> .....	22
4.3.2	<i>Neelektrofilní agonisté TRPA1</i> .....	23
4.3.3	<i>Antagonisté TRPA1</i> .....	25
4.3.4	<i>Modulace TRPA1 vápenatými ionty</i> .....	25
4.4	CHLADOVÁ AKTIVACE A MEZIDRUHOVÉ ROZDÍLY .....	26
<b>5</b>	<b>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>METODIKA</b> .....	<b>29</b>
6.1	TKÁŇOVÉ KULTURY A TRANSFEKCE DNA.....	29
6.2	PŘÍPRAVA DNA KONSTRUKTŮ .....	30
6.3	TRANSFORMACE XL10-GOLD ULTRAKOMPETENTNÍCH BUNĚK KMENE <i>E. COLI</i> METODOU TEPLOTNÍHO ŠOKU .....	31
6.4	IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA A SEKVENACE .....	32
6.5	EXPERIMENTÁLNÍ ROZTOKY .....	32
6.6	ELEKTROFYZIOLOGICKÁ TECHNIKA PATCH-CLAMP .....	33
6.7	STIMULAČNÍ PROTOKOLY, HODNOCENÍ ZÁZNAMŮ A STATISTICKÁ ANALÝZA.....	33
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>36</b>
7.1	CHARAKTERIZACE AKTIVAČNÍCH VLASTNOSTÍ DIVOKÉHO TYPU TRPA1 RECEPTORU.....	36
7.1.1	<i>Aktivace depolarizačním napětím</i> .....	36
7.1.2	<i>Aktivace allyl isothiokyanátem</i> .....	37
7.1.3	<i>Aktivace cinnamaldehydem a modulace vápenatými ionty</i> .....	38
7.2	FUNKČNÍ A STRUKTURÁLNÍ ÚLOHA N-KONCE.....	39
7.2.1	<i>Specifické mutace v primárním modulu – mutant S448T</i> .....	39
7.2.2	<i>Specifické mutace v regulačním modulu – mutant H244R</i> .....	42
7.2.3	<i>Specifické mutace ovlivňující sekundární strukturu ankyrinových repetit – mutant S344D</i> .....	44
7.2.4	<i>Specifické mutace v sekvenčním motivu pro fosforylaci proteinkinázou CDK5</i> .....	45
7.2.4.1	<i>Funkční charakteristika mutantu T673D</i> .....	45
7.2.4.2	<i>Funkční charakteristika mutantu S616A</i> .....	47
7.3	FUNKČNÍ A STRUKTURÁLNÍ ÚLOHA C-KONCE.....	49

7.3.1	<i>Úloha distální části C-konce v inaktivaci.....</i>	49
7.3.2	<i>Aktivace mutantu N1100stop depolarizačním napětím .....</i>	52
<b>8</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>58</b>

## **2 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

AITC	allyl isothiokyanát, agonista TRPA1 receptoru
AK	aminokyselina
ANKTM1	„ankyrine-like transmembrane domain 1“, receptor TRPA1
AR	ankyrinová repetice
ARD	ankyrin repeat domain, ankyrinová doména
B <sub>2</sub>	bradykininový receptor 2
BK	bradykinin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDK5	cyklin-dependentní kináza 5
CGRP	„calcitonin gene-related peptide“, kalcitoninu příbuzný peptid
Cin	cinnamaldehyd, agonista TRPA1 receptoru
CNS	centrální nervová soustava
DAG	diacylglycerol
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
EC <sub>50</sub>	koncentrace agonisty, vyvolávající 50% maximální odpovědi
ECS	extracelulární roztok
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
FBS	fetální hovězí sérum
GFP	„green fluorescent protein“, zelený fluorescenční protein
G <sub>max</sub>	maximální vodivost
GPCRs	„G-protein coupled receptors“, receptory spřažené s G-proteiny
HEDTA	(2-hydroxyethyl)ethylendiamintriocová kyselina
HEK293T	lidské ledvinné embryonální buňky 293T
hTRPA1	lidský TRPA1 receptor
ICS	intracelulární roztok
IP <sub>3</sub>	inositol-3,4,5-trifosfát
kDa	kilodalton
mTRPA1	myší TRPA1 receptor
NGF	nervový růstový faktor
NKA	neurokinin A
PAR <sub>2</sub>	proteázou aktivovaný receptor 2



PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLC	fosfolipáza C
PG	prostaglandin
RR	rutheniová červeň
SEM	střední chyba průměru
SP	substance P
S1 – S6	označení transmembránových domén 1 až 6 monomeru proteinu TRPA1
THC	delta-9-tetrahydrocannabinol
TrkA	receptorová tyrozin kináza A
TRP	„transient receptor potential“, přechodný receptorový potenciál
TRPA1	ankyrinový TRP receptor typu 1
TRPM8	melastatinový TRP receptor typu 8
TRPV1	vaniloidní TRP receptor typu 1
V <sub>1/2</sub>	poloviční hodnota maximální napěťové aktivace
WT	„wild type“, divoký typ TRPA1 receptoru
4-HNE	4-hydroxynonenal
4-ONE	4-oxononenal
15d-PGJ2	15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2

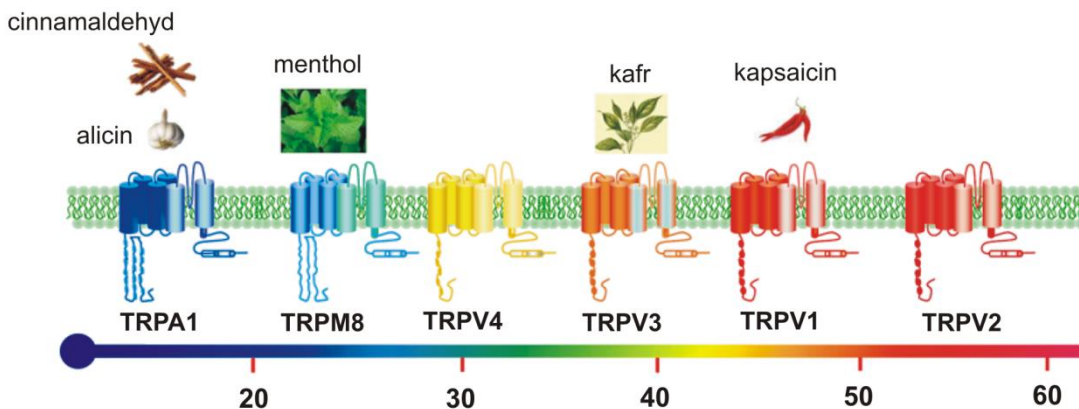
### **3 ÚVOD**

TRP iontové kanály (z anglického „Transient Receptor Potential“) jsou klíčovými převaděči smyslových signálů na nervových i non-neurálních buňkách. Některé TRP kanály se charakteristicky vyskytují v senzoryckých neuronech, zatímco jiné jsou exprimovány v ostatních tkáních a orgánech, jakými jsou pankreas, enterochromafinní buňky, keratinocyty, močový měchýř, nebo plíce (Caterina et al., 1999; Doihara et al., 2009; Denda et al., 2001; Avelino & Cruz, 2006; Fujimura et al., 1995).

Rodina savčích TRP receptorů je kódována 28 geny a na základě sekvenční podobnosti se dělí do šesti podrodin: TRPC (kanonické), TRPM (melastatinové), TRPV (vaniloidní), TRPA (ankyrinové, s jediným savčím zástupcem TRPA1), TRPP (polycystinové) a TRPML (mukolipinové) (Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005). Většina funkčně charakterizovaných TRP kanálů je neselektivní, tj. propustná pro monovalentní i divalentní kationty, z nichž  $Ca^{2+}$  jsou často jejich významnými regulátory (Doerner et al., 2007; Jordt et al., 2004; Wang et al., 2008b).

Společná topologie TRP kanálů se vyznačuje homotetramerickým uspořádáním podjednotek. Každá receptorová podjednotka obsahuje šest transmembránových segmentů a cytoplazmatickou část tvořenou N- a C-terminálními doménami (obr. 1). Pór kanálu je tvořen 5. a 6. transmembránovými helixy a hydrofobními kličkami mezi nimi, obsahujícími krátký pórový helix. Součástí vně orientované části póru je selektivní filtr, který reguluje propustnost a selektivitu kanálu pro ionty (Owsianik et al., 2006; Latorre et al., 2007). Možná úloha vnější pórové oblasti ve vrátkování teplotně aktivovaných TRP kanálů je předmětem intenzivního studia (Grandl et al., 2008; Grandl et al., 2010).

V řadě fyziologických funkcí mají TRP kanály nezastupitelnou úlohu. Významně se podílejí na homeostáze  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$ , detekci teploty a bolestivých podnětů, určení citlivosti neuronů na cizorodé látky, jako jsou štiplavé složky potravin, rostlinné dráždivé deriváty a některé pavoučí toxiny (Hoenderop & Bindels, 2005; Caterina et al., 2000; Jordt et al., 2004). Například TRPV1 receptor je aktivován bolestivým horkem, nízkým extracelulárním pH a kapsaicinem z chilli papriček (Caterina et al., 1997; Steen & Reeh, 1993). TRPA1 je aktivován různými chemickými podněty vyvolávajícími obrannou reakci organismu, včetně reakce na pálivé složky v hořčici, křenu a skořici (Story et al., 2003; Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006).



**Obrázek 1: Schématické znázornění šesti savčích teplotních TRP kanálů** (převzato a upraveno podle Fernández-Carvajal et al., 2011). Každá podjednotka se skládá ze šesti transmembránových domén (S1-S6), póru tvořeného transmembránovými segmenty S5 a S6 a hydrofóbní kličkou mezi nimi, a cytoplazmatického N- a C-konce. Teplotní TRP kanály vykazují odlišné prahy teplotní citlivosti. Každý TRP receptor je také aktivován specifickými přírodními sloučeninami a syntetickými látkami, které jsou rovněž známy schopností vyvolat u lidí příslušné teplotní a/nebo bolestivé pocity.

Z hlediska patofyziologie jsou mutace v genech kódujících TRP kanály příčinou některých dědičných onemocnění, která ovlivňují řadu orgánových soustav nebo fyziologii samotných orgánů. TRP kanálopatie jsou spojovány s polycystickým onemocněním ledvin, skeletální dysplazií, či familiárním epizodickým bolestivým syndromem (Kremeyer et al., 2010; Nilius, 2007).

Tato diplomová práce se zabývá specifickými vlastnostmi ankyrinového receptoru TRPA1, který je jediným členem savčí podrodiny TRP ankyrinových proteinů. Původně byl popsán jako chladově citlivý, neselektivní kationtový kanál (Story et al., 2003), ale jeho role v chladové aktivaci stále ještě není plně objasněna. TRPA1 funguje jako ligandem řízený kanál v heterologních expresních systémech a sensorických neuronech (Ramsey et al., 2006). Jeho další významnou vlastností je polymodalita; může být aktivován in vitro mechanicky, osmoticky, tepelnými nebo chemickými podněty (Story et al. 2003; Jordt et al., 2004; Corey et al., 2004; Zhang et al., 2008; Moran et al., 2011).

TRPA1 receptory jsou exprimovány především v sensorických neuronech zadních kořenů míšních a trigeminálních gangliích (Story et al., 2003), ale i v non-neurálních buňkách a tkáních (například vláskové buňky vnitřního ucha, epitel močového měchýře, fibroblasty) (Nagata et al., 2005; Avelino & Cruz, 2006; Jaquemar et al., 1999). Podobně

jako ostatní TRP kanály je TRPA1 neselektivní, propustný pro malé i větší kationty (Story et al., 2003). Klíčovým regulátorem aktivity TRPA1 jsou intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které mají bimodální účinek: při nízkých koncentracích kanál aktivují, při vyšších koncentracích jej trvale inaktivují (Jordt et al., 2004; Wang et al., 2008b).

Cílem předložené práce je popsat funkční úlohu cytoplazmatických konců TRPA1 receptoru a pomocí elektrofyzilogických a molekulárně-biologických metod se pokusit určit úlohu některých predikovaných fosforylačních míst, která mohou souviset s modulací TRPA1 v nativním prostředí nociceptorů.

## **4 LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **4.1 Fyziologická úloha TRPA1 receptoru**

TRPA1 receptor, jenž je u savců exprimován na C-vláčkách sensorických neuronů společně s nervovým růstovým faktorem, receptorem TrkA a iontovým kanálem TRPV1, je klíčovým regulátorem uvolňování neuropeptidů (Story et al., 2003; Jordt et al., 2004). C-vlákna jsou aferentní vlákna, jež mají buněčná těla v trigeminálních gangliích a v gangliích zadních kořenů míšních a projikují do periferní oblasti, včetně kůže a vnitřních orgánů (Olsson et al., 2006). Poškození tkáně způsobené poraněním nebo onemocněním vede k uvolnění zánětlivých mediátorů, které aktivují neuronální i non-neuronální buňky v místě poškození. Těmito mediátory jsou například bradykinin (BK), prostaglandiny (PG) a glutamát (Basbaum & Wolf, 1999; Olsson et al., 2006; Basbaum et al., 2009). Některé komponenty těchto zánětlivých látek aktivují primární aferentní sensorické neurony, které uvolňují zánětlivé neuropeptidy, jako jsou substance P (SP), neurokinin A (NKA) a kalcitoninu příbuzný peptid (kalcitonin gene-related peptid - CGRP) (Bautista, 2013).

Receptor TRPA1, původně známý jako ANKTM1, je jediným zástupcem ankyrinové podrodiny TRP receptorů u savců. Původně byl objeven při kultivaci lidských fibroblastů (Jaquemar et al., 1999); přestože na základě primární sekvence a hydrofobicity autoři správně předpověděli strukturní uspořádání podobné TRP receptorům, nepodařilo se jim u exprimovaného proteinu prokázat funkci iontového kanálu. To se podařilo později jiným autorům (Story et al., 2003), kteří prokázali expresi ANKTM1 ve specifické skupině sensorických neuronů a zjistili, že je možné jej aktivovat chladem (<17°C) a icilinem, látkou, která vyvolává chladivý pocit u člověka. Následovaly studie, které ukázaly, že TRPA1 je receptorem polymodálního charakteru, neboť jej kromě teplotních podnětů lze aktivovat řadou exogenních a endogenních látek, mechanickým působením a depolarizačním napětím (Bandell et al., 2004; Kwan et al., 2006).

V případě TRPA1 receptoru byly prozatím popsány dva příklady mutací, které se u člověka podílejí na dědičném onemocnění. První typ kanálopatie je způsoben autozomálně dominantní mutací N855S v S4 – S5 oblasti TRPA1, která je příčinou familiárního epizodického bolestivého syndromu. Toto onemocnění se projevuje prudkými bolestmi především v horní části těla, které jsou vyvolány hladověním, vyčerpáním nebo chladem.

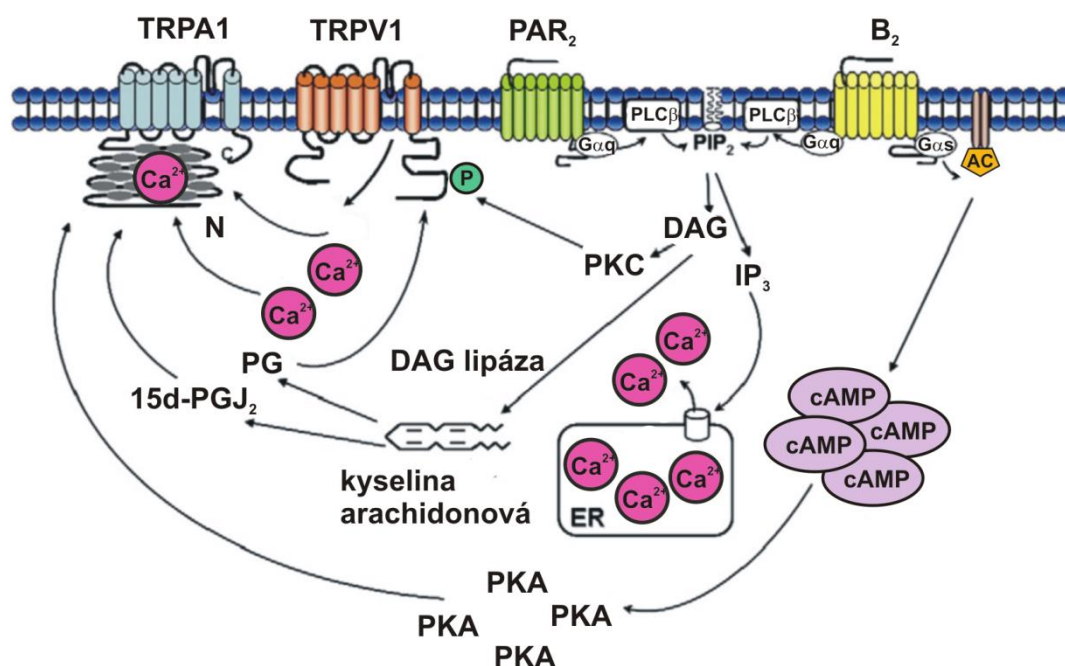
Heterologně exprimovaný mutant TRPA1-N855S má oproti divokému typu receptoru (WT) vyšší proudové odpovědi na negativních potenciálech, avšak maximální proudové odpovědi na reaktivní chemické agonisty zůstávají nezměněny (Kremeyer et al., 2010). Druhý typ poruchy spojené s genetickou variantou TRPA1 receptoru, projevující se paradoxním vnímáním chladových podnětů u pacientů s neuropatickou bolestí, byl popsán v souvislosti s mutací E179K (Binder et al., 2011). Funkční analýza v *in vitro* systému ukázala, že E179K mutant není exprimován při nízkých teplotách, což autoři vysvětlili poruchou v oligomerizaci kanálu (May et al., 2012).

#### **4.1.1 Senzitizace TRPA1 heterologními buněčnými drahami**

TRPA1 receptor může být aktivován přímo, ale také nepřímo senzitivován některými endogenními zánětlivými mediátory. Klíčové pronociceptivní signalizační dráhy mohou nepřímo potencovat aktivitu TRPA1 zvýšením koncentrace intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007), zatímco prozánětlivé mediátory mohou senzitivovat TRPA1 prostřednictvím proteinkinázy C (PKC), nebo fosfolipázy C (PLC) (Wang et al., 2008a). Bylo prokázáno, že aktivace TRP iontových kanálů je propojena se signalizačními drahami receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR) (Clapham, 2003). V této souvislosti Bandell et al. 2004 uvádějí, že TRPA1 je aktivován zánětlivým mediátorem bradykininem přes  $\text{B}_2$  receptor. Stimulace  $\text{B}_2$  receptoru aktivuje fosfolipázu C (PLC), která rozštěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( $\text{PIP}_2$ ) na diacylglycerol (DAG) a inositoltrifosfát ( $\text{IP}_3$ ). Inositoltrifosfát uvolní vápenaté ionty z nitrobuněčných zásob, zatímco DAG aktivuje protein kinázu C (PKC) (obr. 2). Diacylglycerol může být také převeden DAG lipázou na polynenasycené mastné kyseliny, především na kyselinu arachidonovou (Mizumura et al., 2009). Vápenaté ionty uvolněné z nitrobuněčných zásob poté zvyšují citlivost TRPV1, což vede k vtoku vápenatých iontů do buňky TRPV1 kanálem, které spolu s ionty vápníku z nitrobuněčných zásob aktivují TRPA1 (Bautista et al., 2006). Studie Wang et al., 2008a, ukázala, že kromě PLC přispívá k senzitivaci TRPA1 také aktivace cyklického adenosin monofosfátu/ proteinkinázy A (cAMP / PKA) bradykininem v DRG neuronech.

Podobný mechanismus senzitivace TRPA1 probíhá přes proteázou aktivovaný receptor 2 ( $\text{PAR}_2$ ). Proteázou aktivované receptory jsou podskupinou GPCRs, které jsou štěpeny proteázami přímo v extracelulárním aminovém konci vystaveném k navázání

ligandové domény, která se váže na rozštěpený receptor a tím jej aktivuje (Dery et al., 1998; Hollenberg & Compton, 2002).



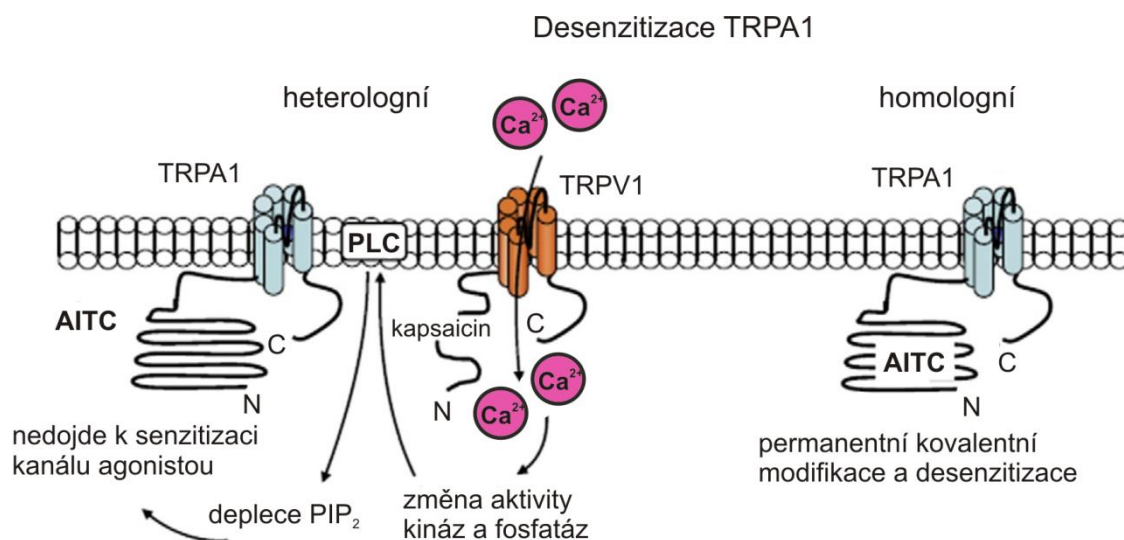
**Obrázek 2: Intracelulární mechanismy senzitivace receptoru TRPA1** (převzato a upraveno podle Andrade et al., 2012). Vazba agonisty na receptor bradykininu B<sub>2</sub> nebo PAR<sub>2</sub> (proteázou aktivovaný receptor 2) spouští dráhu PLCβ (fosfolipázy Cβ) přes Gαq protein. PLCβ štěpí PIP<sub>2</sub> (fosfatidylinositol-4,5-bifosfát) na DAG (diacylglycerol) a IP<sub>3</sub> (inositoltrifosfát). Uvolnění Ca<sup>2+</sup> z intracelulárních zásob pomocí IP<sub>3</sub> přímo senzitivuje TRPA1 vazbou Ca<sup>2+</sup> na EF-hand doménu v N-konci TRPA1. Aktivovaná PKC (protein kináza C) fosforyluje TRPV1 a senzitivuje tento receptor agonisty, které podporují vtok Ca<sup>2+</sup> do buňky. DAG je převeden DAG lipázou na kyselinu arachidonovou (AA). Produkt metabolismu AA 15d-PGJ<sub>2</sub> [15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J<sub>2</sub>] přímo aktivuje TRPA1. PG (prostaglandiny) získané z AA také senzitivují TRPV1. Aktivace B<sub>2</sub> receptoru aktivuje protein Gas, který dále aktivuje syntézu cAMP (cyklický adenosin monofosfát) adenylátcyklázou. Aktivace PKA (proteinkinázy A) cyklickým AMP zvyšuje senzitivitu TRPA1.

#### 4.1.2 Heterologní a homologní desenzitivace TRPA1

Odpověď TRPA1 kanálů se v přetrvávající přítomnosti aktivátorů postupně snižuje, přesné molekulární mechanismy tohoto jevu však nejsou prozatím zcela objasněny. Jedním z možných vysvětlení je desenzitivace vyvolaná aktivací TRPV1 receptoru, který je exprimován v nociceptorech společně s TRPA1.

Akopian et al. 2007 zjistili, že TRPA1 exprimovaný v sensorických neuronech může být heterologně desenzitivován aktivací TRPV1. TRPV1 receptory jsou nejprve

aktivovány specifickým agonistou kapsaicinem, což způsobí okamžitý a dlouhodobý vtok vápenatých iontů a vylití  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob (obr. 3). Zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku spouští depleci fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu ( $\text{PIP}_2$ ), která tlumí aktivaci TRPA1.



**Obrázek 3: Mechanizmy heterologní a homologní desenzitizace TRPA1** (převzato a upraveno podle Andrade et al., 2012) V případě heterologní desenzitizace indukuje vazba kapsaicinu na TRPV1 receptor dlouhodobé zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku. Vysoká hladina intracelulárních vápenatých iontů nepřímě mění aktivitu fosfolipázy C (PLC), což způsobuje depleci fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu ( $\text{PIP}_2$ ). Membránový  $\text{PIP}_2$  je rozhodující pro bazální aktivitu a citlivost TRPA1 k vlastním modulátorům. V mechanismu homologní desenzitizace se allyl isothiokyanát (AITC) váže na N-koncovou část TRPA1, což vyvolá vtok vápenatých iontů do buňky, ale trvalá strukturální modifikace způsobuje desenzitizaci TRPA1 a neumožňuje vazbu jiných aktivačních molekul.

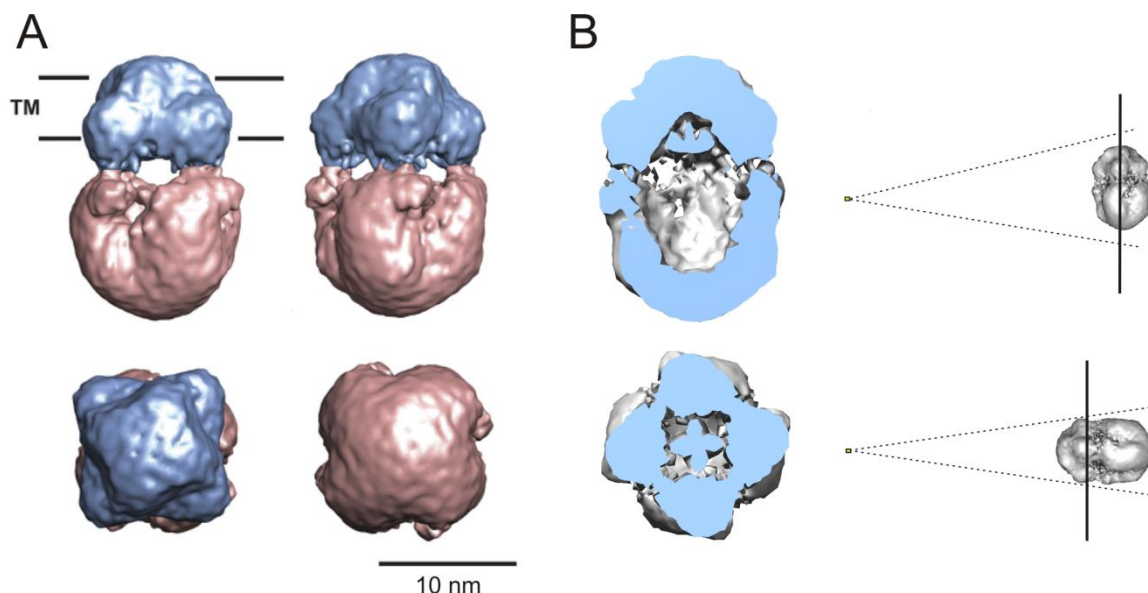
## 4.2 Strukturální vlastnosti TRPA1 receptoru

Lidský receptor TRPA1 je homotetramerem podjednotek o velikosti 1119 aminokyselin s molekulovou hmotností 127,4 kDa (Story et al., 2003), které jsou symetricky uspořádány v cytoplazmatické membráně. Každá podjednotka je topologicky uspořádána do šesti transmembránových domén a cytoplazmatického N- a C-konce (Ramsey et al., 2006). Transmembránová část proteinu, opatřená centrálním pórem, tvoří 22% velikosti podjednotky. N-konec TRPA1 obsahuje nezvykle velké množství (14-18) ankyrinových repetitiv (Sotomayor et al., 2005; Story et al., 2003). Jediným dalším proteinem TRP rodiny receptorů, srovnatelným v počtu ankyrinových repetitiv, je



mechanosenzitivní kanál TRPN1, který však není přítomen v genomech vyšších obratlovců (Gaudet et al., 2008).

V roce 2011 byla pomocí elektronové mikroskopie poprvé podrobně popsána struktura myšního TRPA1 receptoru (mTRPA1) s rozlišením 16 Å (Cvetkov et al., 2011 a Obr. 2). 3-D hustotní mapa zřetelně ukázala transmembránovou oblast a cytoplazmatické konce vytvářející dominantní centrální vestibul, kterým se odlišuje TRPA1 od ostatních TRP kanálů (obr. 4). Rozlišení struktury však neumožňovalo detailní představu o interakcích mezi funkčními doménami. Vzhledem k sekvenční homologii se předpokládalo, že transmembránová oblast TRPA1 je do značné míry podobná TRPV1 kanálu, jehož struktura byla o dva roky později vyřešena pomocí originální statistické metody rekonstrukce struktury získané kryoelektronovou mikroskopií dosahující rozlišení 3,4 Å (Liao et al., 2013). Za pomoci obdobného metodického přístupu byla ve zcela nedávné době publikována i struktura lidského TRPA1 s rozlišením 4.2 Å (Paulsen et al., 2015), která výrazně přispěje k vysvětlení současných experimentálních dat a umožní další pokrok při studiu molekulárních mechanismů aktivace TRPA1 (obr. 5).



**Obrázek 4:** **A) Trojrozměrná rekonstrukce TRPA1 kanálu** (převzato a upraveno podle Cvetkov et al., 2011). Navržený model pomocí elektronové mikroskopie viditelně odlišuje transmembránovou doménu, zobrazenou modře a cytoplazmatickou doménu ve tvaru „zavěšeného košíku“, vyobrazenou růžově. Měřítko 3D struktury je 10 nm. **B) Podélný a příčný řez kanálem.** U podélného i příčného řezu je v oblasti vnitřního ústí kanálu patrná transmembránová oblast S6 v blízkosti proximální části C-konce, která má funkční roli ve vrátkování kanálu. Podélný řez navíc zobrazuje dominantní vnitřní dutinu kanálu.

#### **4.2.1 Transmembránová oblast TRPA1**

Jednotlivé transmembránové segmenty jsou vzájemně propojeny kličkami, přičemž kličky mezi segmenty S1 a S2 a mezi S3 a S4 jsou orientovány extracelulárně. Klička mezi segmenty S5 a S6 je částečně hydrofobní, obsahuje dva kratší pórové helixy a podílí se na vytvoření centrálního póru kanálu. Horní část póru je opatřena selektivním filtrem, který zajišťuje propustnost kanálu pro monovalentní i divalentní kationty (Banke et al., 2010; Chen et al., 2009; Paulsen et al., 2015).

Vrátkovací mechanismus iontového kanálu dosud nebyl zcela objasněn. Rezidua vnitřní pórové oblasti kanálu jsou pravděpodobně zodpovědná za napětřovou a chemickou aktivaci receptoru a mutace jednotlivých aminokyselinových zbytků v této oblasti specificky ovlivňují vrátkování kanálu. Je známo, že velmi důležitou úlohu v modulaci receptoru TRPA1 mají vápenaté ionty. Na základě měření změn propustnosti pro vápenaté ionty bylo identifikováno několik aminokyselinových zbytků, které se významně podílejí na vrátkování kanálu (Samad et al., 2011).

Reziduum Asp915, ekvivalent rezidua Asp379 u draslíkového kanálu  $K_v1.2$ , je pravděpodobně součástí selektivního filtru. Záměnou Asp915 za alanin byla prokázána snížená propustnost vápenatých (Wang et al., 2008b) a zinečnatých (Hu et al., 2009) iontů iontovým kanálem TRPA1. V napětřově závislém vrátkování kanálu hraje zásadní úlohu Lys906 (Wan et al., 2013).

V porovnání s cytoplazmatickými částmi molekuly receptoru je transmembránová oblast nejvíce konzervovanou částí napříč rodinou TRP receptorů. Intracelulárně orientované N- a C- konce jsou tvořeny nejméně konzervovanými aminokyselinovými residui, a proto se předpokládá, že cytoplazmatická část receptoru může obsahovat funkční domény, které se podílejí na specifických vlastnostech receptoru (Story et al., 2003).

#### **4.2.2 N-koncová část TRPA1**

N-konec TRPA1 představuje 64% celkové velikosti proteinu (Cvetkov et al., 2011). Oproti některým dalším členům TRP rodiny iontových kanálů se N-konec TRPA1 vyznačuje neobvykle vysokým počtem ankyrinových repetit (16 - 17) (Paulsen et al., 2015; Gaudet et al., 2008). Nejnovější studie překvapivě prokázaly vzájemnou interakci obou cytoplazmatických konců (Paulsen et al., 2015 a obr. 5)

Ankyrinová repetice (AR) je krátký sekvenční motiv tvořený nejčastěji 33 aminokyselinami, jejichž sekvence je konzervovaná mezi ankyrinovými proteiny. Sekundární struktura AR je tvořena dvěma antiparalelními  $\alpha$ -šroubovicemi spojenými otáčkou. Ankyrinové repetice se vyskytují v tandemovém uspořádání a tvoří protáhlé domény důležité pro protein-proteinové interakce (Sotomayor et al., 2005). Ankyrinové repetice obsahují charakteristický tetrapeptidový motiv TPLH nebo jeho variantu T / SxxH, který se nachází na začátku strukturálního motivu helix-otáčka-helix a pravděpodobně přispívá ke konformační stabilitě ankyrinů prostřednictvím sítě vodíkových můstků (Guo et al., 2010).

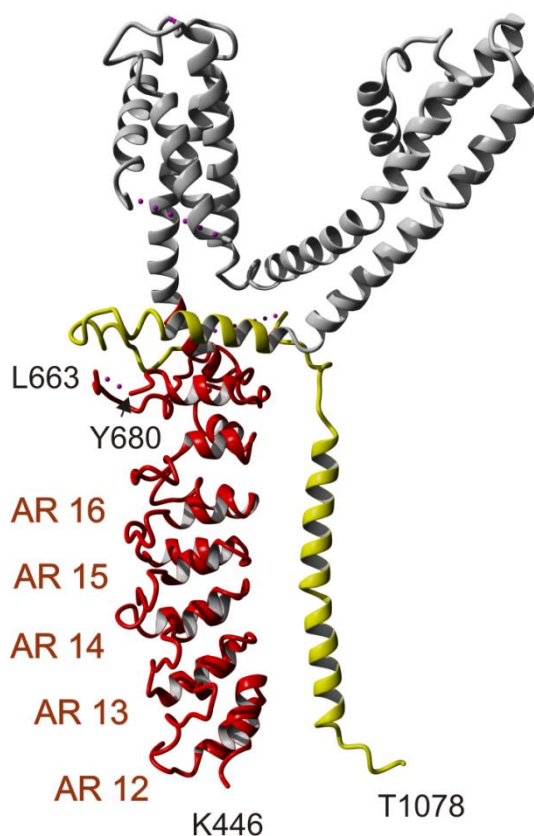
Předpokládá se, že cytoplazmatický N-konec hraje důležitou roli při vrátkování kanálu, neboť elektrofilní agonisté aktivují kanál kovalentní modifikací konzervovaných cysteinových a lysinových reziduí přímo v N-koncové doméně (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007). U lidské TRPA1 jsou to tři cysteinová rezidua Cys621, Cys641 a Cys665, která se nacházejí ve spojovací oblasti mezi N-koncem a první transmembránovou doménou. Mutace všech tří aminokyselinových zbytků činí kanál necitlivý k aktivaci isothiokyanáty, s výjimkou velmi vysoké ( $> 100 \mu\text{M}$ ) koncentrace, kdy modifikace blízkého lysinu 710 vyvolává malé a trvalé odpovědi (Hinman et al., 2006). Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo prokázáno, že cysteiny zapojené do kovalentní modifikace mohou mezi sebou tvořit disulfidové můstky (Wang et al., 2012).

N-koncová cytoplazmatická oblast TRPA1 je jednotka, která dokáže rozpoznávat teplotní i chemické stimuly, stejně tak i odpovědi na sekundární buněčné posly, především cytoplazmatické vápenaté ionty. Byla vyslovena hypotéza bimodálního uspořádání N-terminálních ankyrinových repetic, ve kterých je tepelná a chemická citlivost soustředěná do dvou nezávislých modulů (Cordero-Morales et al., 2011). Studie Cordero-Morales et al., 2011 ukazuje, že existují dva prostorově odlišné moduly ankyrinových repetic; regulační modul (AR 3-8) a primární modul (AR 10-15). Každý modul je schopen rozpoznat tepelné nebo chemické podněty hadího i savčího TRPA1.

Důkladnou analýzou lidské a chřestýší chiméry TRPA1 bylo lokalizováno místo pro  $\text{Ca}^{2+}$ -závislou desenzitizaci v AR 11 (Cordero-Morales et al., 2011). Zajímavé je, že převládající místo  $\text{Ca}^{2+}$ -závislé desenzitizace (AR 11) se překrývá s primárním modulem. To je v souladu se zjištěním, že silná chemická citlivost a  $\text{Ca}^{2+}$ -závislá desenzitizace jsou funkčně spojeny s lidským TRPA1 kanálem, zatímco ani teplem, ani allyl isothiokyanátem

(AITC) vyvolané odpovědi, neukazují na výraznou desenzitizaci chřestýšího TRPA1 kanálu.

Ve 12. ankyrinové doméně bylo predikováno vazebné místo pro vápenaté ionty, tzv. EF-hand doména, složená z 12 reziduí (Asp468 - Asp479) (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007). Význam tohoto EF-hand vazebného místa je diskutabilní, protože bodové mutace v této oblasti mají malý vliv na  $\text{Ca}^{2+}$ -závislý aktivační mechanismus, zatímco delece EF-hand motivu narušuje dopravení zkráceného kanálu k plazmatické membráně (Nilius et al., 2011). Mechanismus modulace TRPA1 receptoru vápenatými ionty zůstává doposud nejasný, některé studie naznačují mechanismus přímou vazbou vápenatých iontů na EF-hand motiv (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007) a jiné naznačují, že existuje nepřímý, na kalmodulinu nezávislý mechanismus neznámé povahy (Wang et al., 2008b).



**Obrázek 5:** *Struktura podjednotky TRPA1 receptoru (převzato a upraveno dle Paulsen et al., 2015). Šedě je vyznačena transmembránová oblast, žlutě je vyznačen C-konec receptoru. N-konec, označený červeně, obsahuje ankyrinové repetice primárního modulu v helikálním uspořádání. Primární sekvence začíná reziduem Lys446, které je součástí 12. ankyrinové repetice, a končí reziduem Thr1078 v distální části C-konce. V oblastech vyznačených tečkami je neobjasněná sekundární struktura.*

### 4.2.3 C-koncová část TRPA1

Primární struktura C-konce TRPA1 je tvořena 154 aminokyselinami, což tvoří 14% celkové velikosti receptoru (Cvetkov et al., 2011). Na C-konci je predikováno šest helikálních segmentů (H1 - H6), které mají funkční úlohu v chemické a napěťové modulaci receptoru. V úseku mezi helixy H4 a H5 karboxylového konce se nachází vysoce konzervovaný úsek kyselých aminokyselin 1077 Glu Thr Glu Asp Asp Asp 1082, který pravděpodobně představuje jedno z vazebných míst pro vápenaté ionty. Postupná neutralizace čtyř konzervovaných reziduí (Glu1077, Asp1080 - Asp1082) v lidském TRPA1 vykazovala významné účinky na napěťově a  $\text{Ca}^{2+}$ - závislou potenciaci a / nebo inaktivaci odpovědi vyvolané agonisty (Surá et al., 2012).

Zkrácení C-konce o 20 reziduí selektivně zpomalilo  $\text{Ca}^{2+}$ - závislou inaktivaci bez ovlivnění ostatních funkčních parametrů. Naproti tomu zkrácení C- konce o 26 reziduí učinilo kanál necitlivý ke všem testovaným podnětům (napěťová stimulace, aktivace agonistou a vápenatými ionty), což naznačuje důležitou funkční úlohu distální části C-konce, zejména strukturální úlohu šroubovice H5 (Surá et al., 2012).

Bazická rezidua C-konce, jejichž mutacemi se významně snížila schopnost receptoru být aktivován AITC, mohou být součástí transdukční části receptoru, která se podílí na přenosu aktivačních signálů (Samad et al., 2011). Záměna Lys969 za glutamát nevykazovala významné změny v průměrné amplitudě proudů vyvolaných allyl isothiokyanátem (AITC), ale postrádala první, postupně se zvyšující aktivační fázi. To by mohlo naznačovat, že jsou pozměněny vlastnosti vrátkování kanálu, anebo vápenaté ionty přispívají mnohem rychleji k potenciaci odpovědi (Samad et al., 2011). Naproti tomu mutace K1092A a R1099A v distální části C-konce značně narušila citlivost na AITC (Samad et al., 2011).

Neutralizace tří reziduí umístěných v prvním proximálním helixu (H1), Arg975, Lys988 a Lys989 nahrazením za alanin, významně zvýšila citlivost na depolarizační napětí, což naznačuje, že tato rezidua mohou být přímo zapojena do napěťové modulace TRPA1 kanálu (Samad et al., 2011).

### 4.3 Farmakologické vlastnosti TRPA1 receptoru

Receptor TRPA1 je aktivován mnoha exogenními i endogenními sloučeninami, které mají dráždivé účinky a jejich zásadní role v nociceptivních drahách je spojována se schopností navodit zánětlivé nebo bolestivé stavy (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006; McNamara et al., 2007). Obecně lze sloučeniny, které aktivují TRPA1, rozdělit na látky elektrofilní povahy, které se kovalentně vážou na receptor, a látky nepolární, interagující s TRPA1 prostřednictvím mechanismu ligand-receptor (Baraldi et al., 2010).

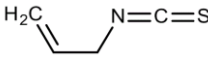
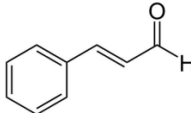
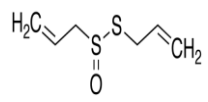
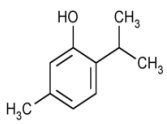
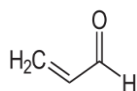
#### 4.3.1 Kovalentní modifikace

Nejlépe charakterizovaným mechanismem aktivace TRPA1 je kovalentní modifikace thiolových skupin konzervovaných cysteinových zbytků, které se nacházejí v oblasti, která spojuje ankyrinové repetice s transmembránovými doménami. Strukturně funkční analýzy identifikovaly tři zásadní konzervovaná cysteinová rezidua pro lidský TRPA1 receptor (Cys619, Cys639, Cys663) a pět cysteinových reziduí pro myší receptor TRPA1 (Cys415, Cys421 - tyto dva cysteiny jsou v oblasti ankyrinových domén, Cys622, Cys642, Cys666), která jsou nezbytným předpokladem pro správnou aktivaci kanálu elektrofilními látkami (MacPherson et al., 2007; Hinman et al., 2006).

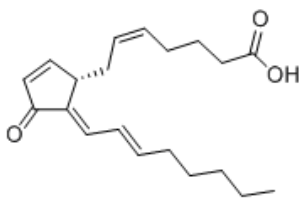
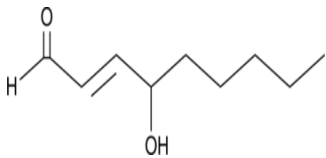
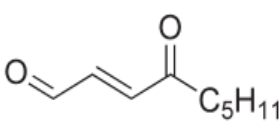
Mezi exogenní agonisty, obsahující elektrofilní uhlík nebo síru patří isothiokyanáty a thiosulfináty, které jsou rostlinného původu (Tab. 1). Vyskytují se například v hořčici (allyl isothiokyanát, AITC), skořici (cinnamaldehyd) a v cibulovinách, jako je česnek nebo šalotka (alicin) (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2005; Jordt et al., 2004; MacPherson et al., 2005).

Látkami elektrofilní povahy jsou také některé endogenní produkty metabolismu a mediátory zánětu, které vznikají vlivem oxidačního stresu (Tab. 2). Účinným aktivátorem TRPA1 je 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2), produkt metabolismu mastných kyselin cyklooxygenázové kaskády (Taylor-Clark et al., 2008). K dalším sloučeninám spojeným se zánětlivými procesy patří NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\alpha$ ,  $\beta$ -nenasycené aldehydy nebo 4-hydroxynonenal, produkt peroxidace lipidů v důsledku uvolnění reaktivních kyslíkových radikálů (Basbaum & Woolf, 1999; Seiler et al., 2008).

**Tab. 1: Příklad některých exogenních kovalentních aktivátorů TRPA1**

Název	Allyl isothiokyanát	Cinnamaldehyd	Alicin	Thymol	Akrolein
Výskyt	hořčice, křen	skořice	cibule, česnek	tymián	výfukové plyny
Struktura					

**Tab. 2: Příklad endogenních kovalentních aktivátorů TRPA1**

Název	15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2)	4-hydroxynonenal (4-HNE)	4-oxononenal (4-ONE)
Struktura			

#### 4.3.2 Neelektrofilní agonisté TRPA1

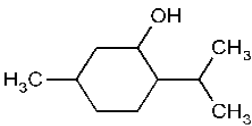
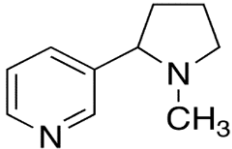
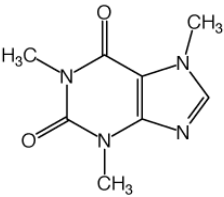
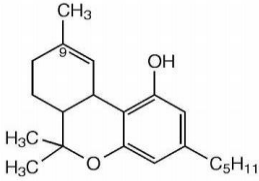
Další skupinou agonistů TRPA1 jsou látky nepolární povahy, jež interagují s receptorem přímou vazbou založenou na principu zámku a klíče (Xiao et al., 2008a a Tab. 3). Mnoho nekovalentních modulátorů TRPA1 vykazuje bimodální účinek, což znamená, že při nízké koncentraci kanál aktivují a při vyšších koncentracích jej inhibují. Na tomto principu je založen účinek mentolu, který byl původně považován za výhradního agonistu receptoru TRPM8. Submikromolární a nízké mikromolární koncentrace mentolu způsobují aktivaci receptoru, zatímco vyšší koncentrace vedou k jeho reverzibilní inaktivaci (Karashima et al., 2007). Bylo prokázáno, že mentol se váže mezi 5. a 6. transmembránovou doménu lidského TRPA1 prostřednictvím reziduí Ser876, Thr877 a Gly878, která jsou také vazebnými místy jiných nekovalentních TRPA1 modulátorů, jako např. blokátoru AMG 5445 a AP18 (Xiao et al., 2008a).

Dalším příkladem druhově závislého agonisty TRPA1 je kofein. Kofein je aktivátorem myšního TRPA1 (mTRPA1), ale inhibuje lidský ortholog. Záměnou methioninu Met268 v myším TRPA1 za prolin, jenž se nachází na analogické pozici v sekvenci lidského TRPA1 (Pro267), se změnil účinek kofeinu z agonisty na inhibitor (Nagatomo et al., 2010; Nagatomo & Kubo, 2008).

Bimodálním účinkem se vyznačuje také nikotin, jehož lokální aplikace je využívána v nikotinové substituční léčbě. Nízké koncentrace nikotinu způsobují podráždění sliznice a kůže v důsledku aktivace TRPA1, naproti tomu vyšší koncentrace kanál inhibují. Předpokládá se, že blokováním aktivace TRPA1 může být usnadněn proces odvykání kouření (Talavera et al., 2009).

Mezi nekovalentní agonisty a parciální agonisty se dále řadí některé syntetické látky (chlorpromazin, isofluran, propofol, desfluran), používané především jako anestetika, antipsychotika nebo antibiotika (Hill & Schaefer, 2007; Andersson et al., 2009; Matta et al., 2008). Některé neelektrofilní sloučeniny (např. paracetamol) mohou být v organismu metabolizovány na elektrofilní produkty, které ovlivňují funkci TRPA1 (Nassini et al., 2010; Andersson et al., 2011).

**Tab. 3: Příklad nepolárních aktivátorů TRPA1.**

Název	Výskyt	Struktura	Typ vazby
<b>Mentol</b>	<i>máta</i>		nekovalentní vazba na 5. transmembránovou doménu
<b>Nikotin</b>	<i>tabák</i>		nekovalentní interakce
<b>Kofein</b>	<i>káva</i>		nekovalentní interakce
<b>THC</b>	<i>konopí</i>		nekovalentní interakce



### 4.3.3 Antagonisté TRPA1

Receptory TRPA1 vyšších živočišných druhů, jenž jsou citlivé na AITC, mohou být inhibovány řadou organických a anorganických sloučenin, mezi které se řadí kafr, gentamycin, amilorid nebo rutheniová červeň (RR), jež je nespecifickým blokátorem TRP kanálů (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005; Xu et al., 2005; Banke, 2011).

V současné době jsou vyvíjeny specifické blokátory TRPA1 receptorů, ale pouze některé z těchto molekul byly zatím použity pro preklinické studie *in vivo*. Sloučenina HC-030031 a její analog Chembridge-5861528 inhibují vtok vápenatých iontů do buňky indukovaný agonisty TRPA1 (McNamara et al., 2007). HC-030031 navíc snižuje akutní a chronickou zánětlivou a neuropatickou bolest bez negativního ovlivnění koordinace motoriky nebo chladové detekce u hlodavců (McNamara et al., 2007; Eid et al., 2008). Stejně tak sloučenina A-967079, která je strukturně podobná AP-18 a váže se na TRPA1 v oblasti mezi S5, S6 a prvním pórovým helixem (Paulsen et al. 2015), snižuje chladovou hypersenzitivitu po poranění nervu bez ovlivnění akutní reakce na chlad (Chen et al., 2011; McGaraughty et al., 2010).

### 4.3.4 Modulace TRPA1 vápenatými ionty

Jedním z nejdůležitějších fyziologických aktivátorů TRPA1 jsou ionty vápníku, které vstupují kanálem z extracelulární strany nebo jsou uvolněny z intracelulárních zásob. V závislosti na aktivačním stavu kanálu  $\text{Ca}^{2+}$  ionty dynamicky řídí nejdůležitější vlastnosti TRPA1, jako je vodivost, iontová selektivita nebo pravděpodobnost otevření kanálu (Nagata et al., 2005; Cavanaugh et al., 2008; Patil et al., 2010; Nilius et al., 2011).  $\text{Ca}^{2+}$  ionty z intracelulární strany aktivují kanál již při mikromolárních koncentracích ( $\text{EC}_{50} = 905 \pm 249 \text{ nM}$ ) a mechanismus regulace TRPA1 vápenatými ionty je nezávislý na kalmodulinu a jiných  $\text{Ca}^{2+}$  vázajících proteinech (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007). Je známo, že intracelulární vápenaté ionty rychle potencují chemicky a napětím indukované odpovědi receptoru. Po této potenciaci následuje téměř úplná a ireverzibilní inaktivace a oba tyto procesy jsou urychlovány při vyšších intracelulárních koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Wang et al., 2008b). Desenzitizace je navíc podpořena přísunem vápenatých iontů z extracelulárního prostoru. Wang et al., 2008b poprvé ukázali, že potenciace a

inaktivace (desenzitizace) jsou dva nezávislé procesy, přesné molekulární mechanismy  $\text{Ca}^{2+}$  – závislé aktivace a inaktivace však doposud nebyly uspokojivě objasněny.

Předpokládaným vazebným místem pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty je oblast s kyselými rezidui na intracelulárním N-konci TRPA1 receptoru. Tento strukturní motiv je nazýván EF-hand doménou (Zurborg et al., 2007; Doerner et al., 2007) a podle autorů studie (Zurborg et al., 2007) je TRPA1 receptor aktivován přímou vazbou  $\text{Ca}^{2+}$  na tuto doménu. Výsledky pozdějších studií však ukázaly, že záporně nabitě aminokyselinové zbytky v EF-hand doméně hrají spíše strukturní úlohu při stabilizaci ankyrinové domény, než v  $\text{Ca}^{2+}$  - závislé potenciaci a inaktivaci TRPA1 (Nilius et al., 2011; Wang et al., 2008b, Cordero-Morales et al., 2011).

V cytoplazmatickém C-konci identifikovala nedávná studie oblast záporně nabitých reziduí, která by mohla sloužit jako vazebné místo pro intracelulární vápenaté ionty. Tato oblast byla predikována v blízkosti dvou předposledních helixů H4 a H5 (Samad et al., 2011). Tyto dvě šroubovice obsahují vysoce konzervovaný úsek kyselých aminokyselin, 1077 Glu Thr Glu Asp Asp Asp 1082, a sdílejí podstatné sekvenční podobnosti s  $\text{Ca}^{2+}$  vázající doménou nalezenou v hBest1 kanálu (Xiao et al., 2008b), jenž je členem tak zvané „ $\text{Ca}^{2+}$  bowl domain“ superrodiny BK kanálů (Yuan et al., 2010). Studie Surá et al., 2012 dokládá, že se výše zmíněný konzervativní kyselý motiv podílí na modulaci TRPA1 zprostředkované vápenatými ionty.

#### **4.4 Chladová aktivace a mezidruhové rozdíly**

Chladová aktivace byla poprvé pozorována u myšího TRPA1 receptoru exprimovaného v ovariálních buňkách křečků čínských při prahové hodnotě  $17^{\circ}\text{C}$  (Story et al., 2003). Řada následných studií potvrdila účinnou aktivaci savčího TRPA1 při  $17^{\circ}\text{C}$  v heterologním expresním systému (del Camino et al., 2010; Karashima et al., 2009; Kremeyer et al., 2010; Sawada et al., 2007; Story et al., 2003), avšak jiné studie chladovou aktivaci překvapivě nezaznamenaly (Cordero-Morales et al., 2011; Jordt et al., 2004; Knowlton et al., 2010; Nagata et al., 2005; Zurborg et al., 2007).

Autoři jedné z původních studií se domnívali, že chladová citlivost TRPA1 receptoru závisí na době trvání aktivačního podnětu a k aktivaci receptoru může dojít nejdříve za ~30 vteřin (Jordt et al., 2004; Kwan & Corey, 2009). Tato velmi pomalá

aktivace TRPA1 byla nejprve přičítána postupnému, chladem vyvolanému zvýšení hladiny intracelulárních vápenatých iontů potřebných pro otevření kanálů TRPA1 (Zurborg et al., 2007), pozdější studie však prokázaly, že TRPA1 může být aktivován chladem přímo, nezávisle na vápníku (Karashima et al., 2009; del Camino et al., 2010).

Možnost přímé aktivace savčích TRPA1 chladem však naproti tomu nepotvrdila nedávná studie, která porovnávala chladovou senzitivitu TRPA1 orthologů myši, potkana, člověka a opice makak rhesus (*Macaca mulatta*) (Chen et al., 2013). Tato studie ukázala, že zatímco všechny čtyři typy receptorů jsou aktivovány agonistou AITC, chladem jsou aktivovány pouze myši a potkaní orthology. V myším a potkaním TRPA1 byl v 5. transmembránovém segmentu identifikován glycin 878, jenž je zodpovědný za chladovou citlivost těchto orthologů. Záměnou Gly878 za valin, ekvivalent rezidua lidské a opičí TRPA1 (Val875), došlo ke ztrátě chladové citlivosti potkaní TRPA1.

Přestože prozatím nebylo s jistotou prokázáno, zda je TRPA1 receptorem pro detekci bolestivého chladu *in vivo*, na základě jeho funkce u některých nižších živočišných druhů se předpokládá, že se tento receptor evolučně vyvinul pro detekci teplotních podnětů. Funkční studie na receptorech vyklonovaných z nižších živočichů ukazují, že TRPA1 může být aktivován nikoliv chladem, ale teplem (Cordero-Morales et al., 2011). Některé druhy hadů (chřestýši, hroznýši a krajty) využívají vlastní termosenzitivní TRPA1 receptor pro detekci infračerveného záření (Gracheva et al., 2010), hmyzí TRPA1 receptory citlivé na teplo podobně přispívají k vyhýbání se vysokým teplotám (Rosenzweig et al., 2005; Kang et al., 2010; Kohno et al., 2010). Termosenzitivní TRPA1 receptory nižších živočichů ale překvapivě vykazují sníženou citlivost k elektrofilním látkám (AITC), přestože se jejich molekulární struktura příliš neliší od savčích orthologů (Gracheva et al., 2010).

## **5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Předložená diplomová práce se zaměřuje na čtyři důležité oblasti cytoplazmatických konců TRPA1 receptoru: a) primární modul a b) regulační modul N-koncové ankyrinové domény (ARD), c) spojovací oblast mezi ARD a prvním transmembránovým segmentem a d) distální oblast karboxylového konce.

Cílem předložené práce je:

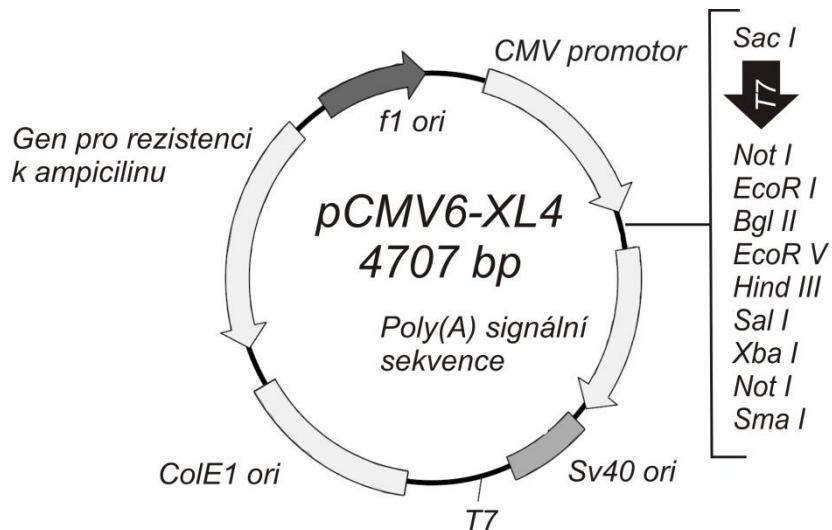
1. Elektrofyzilogickými technikami charakterizovat membránové proudy zprostředkované rekombinantním TRPA1 receptorem, vyvolané depolarizujícím napětím a elektrofilními látkami
2. Nalézt a funkčně ověřit záměnu v některém z T/SPLH motivů, která by mohla významně ovlivnit primární modul ARD
3. Pomocí bodové mutageneze destabilizovat 6. ankyrinovou receptici a navrhnout možný strukturální význam regulačního modulu pro funkci TRPA1 kanálu
4. Určit možnou úlohu T/SPLH motivu na N-konci jako predikovaného místa pro fosforylaci proteinkinázou CDK5
5. Ověřit, že distální část C-konce se podílí na regulaci TRPA1 vápenatými ionty a určit funkční parametry, které jsou ovlivněny jejím odstraněním

## **6 METODIKA**

### **6.1 Tkáňové kultury a transfekce DNA**

Pro transfekci DNA jsme používali buňky HEK293T, které oproti HEK293 buňkám obsahují navíc T-antigen z viru SV-40 (simian virus 40 „large tumor antigen“). T-antigen působí jako silný induktor DNA syntézy, váže se na ori místo (origin of replication) a umožňuje masivnější pomnožení transfekovaných plazmidů v těchto buňkách. Buňky byly přechovávány zamražené v tekutém dusíku a pro experimenty byla použita vždy jedna linie, která ztrácí svoji vitalitu přibližně dvacátou pasáží. Buňky HEK 293T byly kultivovány v mediu OPTI-MEM (Life Technologies, USA), které bylo doplněno 5% fetálním hovězím sérem (PAN Biotech GmbH, SRN), na miskách pokrytých poly-L-lyzinem (Sigma-Aldrich, USA) s hustotou přibližně 180 000 buněk/cm<sup>2</sup>.

HEK 293T buňky byly přechodně transfekovány rekombinantní cDNA lidského ankyrinového receptoru (hTRPA1) ve vektoru pCMV6-XL4 (OriGene, USA) (obr. 6) v koncentraci 400 ng na misku pomocí metody MATra („Magnet-Assisted Transfection“; IBA GmbH, SRN). Pro identifikaci pozitivně transfekovaných buněk při elektrofyziologických měřeních byly buňky současně transfekovány zeleným fluorescenčním proteinem neseným ve vektoru pQBI 25 (TaKaRa, Japonsko), a to v koncentraci 200 ng na misku. K transfekční směsi bylo přidáno 50 µl media OPTI-MEM a směs byla inkubována po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Po 20-minutové inkubaci byla transfekční směs aplikována na buňky, které byly vloženy do inkubačního boxu na permanentní magnet při teplotě 37°C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>. Po pasážování byly transfekované buňky rozmístěny na sklíčka pokrytá poly-L-lyzinem (tři sklíčka o průměru 12 mm na jedné misce o průměru 35 mm).



**Obrázek 6:** Mapa vektoru *pCMV6-XL*, převzato a upraveno dle: <http://www.origene.com/cdna/vectordiagram.msp>

## 6.2 Příprava DNA konstruktů

Bodové mutace byly vnášeny do přirozené sekvence genu kódující receptor TRPA1 metodou PCR (polymerase chain reaction). Navrhování primerů probíhalo dle následujících parametrů:

- délka přibližně 30 nukleotidů
- co nejvíce C-G párů bází
- vnesená bodová záměna přibližně uprostřed sekvence primeru

Sekvence primerů byla následující:

- **mutace S448T: TCA → ACA**

SENSE: 5'- GCA AAG ATA AGA AAA CAC CTC TGC ATT TTG CAG CC -3'

ANTISENSE: 5'- GGC TGC AAA ATG CAG AGG TGT TTT CTT ATC TTT GC -3'

- **mutace H244R: CAC → CGC**

SENSE: 5'- GCC ACC CCT CTC CGC CTG GCT GTG CAA AAT G -3'

ANTISENSE: 5'- CAT TTT GCA CAG CCA GGC GGA GAG GGG TGG C -3'

- **mutace N1100STOP: AAT → TAG**

SENSE: 5'- CAG ATG GAA CAA AGG TAG AGC AGA TGG AAT AC -3'

ANTISENSE: 5'- GTA TTC CAT CTG CTC TAC CTT TGT TCC ATC TG -3'

Reakční směs pro PCR reakci (50  $\mu$ l) obsahovala:

mateřskou DNA (200 ng)	1 $\mu$ l
4x zředěný primer up (25 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
4x zředěný primer down (25ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Buffer 10x	5 $\mu$ l
Quick Solution	3 $\mu$ l
dNTPs (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Pfu Ultra (DNA polymeráza)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	37 $\mu$ l

---

Reakční směs byla umístěna do PCR zařízení s následujícími nastavenými parametry:

95°C 1 min

95°C 50 s

51°C 50 s

68°C 16 min

68°C 10 min

hold 4°C

Po dokončení PCR reakce jsme ke směsi přidali 1  $\mu$ l dPN1 endonukleázy a uložili směs na 1 hodinu do termostatu při 37°C.

### **6.3 Transformace XL10-Gold ultrakompetentních buněk kmene *E. coli* metodou teplotního šoku**

K transformaci byly použity ultrakompetentní buňky XL10-Gold kmene *E. coli*, které byly s  $\beta$ -merkптоethanolem uchovávány při -85°C. Po rozmrazení těchto dvou složek bylo k 30  $\mu$ l buněk přidáno 2  $\mu$ l  $\beta$ -merkптоethanolu. Po promíchání směsi byly přidány 2  $\mu$ l výsledné směsi z PCR reakce, poté byl obsah mikrozkuřavky opět promíchán a inkubován na ledu po dobu 30 minut. Vodní lázeň byla předeřřáta na 42°C a po uplynutí stanoveného času byla mikrozkuřavka s transformační směsí ponořena na 45 s do vodní lázně a následně zchlazena 2 minuty na ledu. Poté bylo ke směsi přidáno 200  $\mu$ l LB média, předeřřátého na 42°C, a směs byla za stálého třepání inkubována 1 hodinu při 37°C. Po inkubaci byl obsah transformační směsi asepticky vyset na agarovou plotnu obsahující

ampicilin o výsledné koncentraci 71,5  $\mu\text{M}$ . Agarová plotna byla umístěna do inkubátoru nastaveného na 37°C po dobu 16-20 hodin.

Z narostlých bakteriálních kolonií bylo sterilní špičkou vybráno několik samostatných a vzdálených kolonií, které byly následně odpíchnuty a přemístěny do zkumavky s 6 ml LB média a ampicilinem o koncentraci 14,3  $\mu\text{M}$ . Zkumavky byly ponechány 16 hodin v rotačním inkubátoru při 37°C a po uplynutí této doby byl obsah zkumavek ještě centrifugován. Po odstranění supernatantu byly buňky připraveny k izolování plazmidové DNA.

#### **6.4 Izolace plasmidové DNA a sekvenace**

Při izolaci plasmidové DNA jsme postupovali podle návodu v komerčně dodávaném kitu „High-Speed Plasmid Mini Kit“ (Geneaid, USA). Bakteriální peleta byla resuspendována ve 200  $\mu\text{l}$  roztoku PD1, obsahující RNAsu a přenesena do mikrozumavky. Bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  pufru PD2, obsah mikrozumavky byl několikrát promíchán otočením dnem vzhůru a poté inkubován při pokojové teplotě po dobu 2 minut. Dále bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  pufru PD3 a směs opět několikrát promíchána a odstředěna po dobu 3 minut. Supernatant byl přemístěn na kolonku, centrifugován 60 s, filtrát odstraněn a kolona promyta 400  $\mu\text{l}$  roztoku W1. Po další 60s centrifugaci a odstranění supernatantu byla kolona promyta 600  $\mu\text{l}$  promývacího pufru (Wash Buffer). Po centrifugaci byla samotná kolonka umístěna do čisté mikrozumavky a přidáno 50  $\mu\text{l}$  elučního pufru (Elution Buffer) pro uvolnění DNA z kolonky. Po 2 minutách byla DNA eluována z kolonky centrifugací po dobu 2 minut. Pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 byla změřena koncentrace DNA u výsledných vzorků. Výsledný produkt izolace DNA byl ověřen sekvenací u firmy Biogen Praha s.r.o..

#### **6.5 Experimentální roztoky**

Všechny chemikálie použité pro přípravu roztoků byly od firmy Sigma-Aldrich, USA.

Kontrolní extracelulární roztok obsahoval (mM): NaCl (160), KCl (2,5), CaCl<sub>2</sub> (1), MgCl<sub>2</sub> (2), HEPES (10), glukóza (10), pH bylo upravováno pomocí NaOH na hodnotu 7,3. Osmolalita extracelulárního roztoku byla 320 mOsm.



Pro plnění elektrod byl použit intracelulární roztok, který obsahoval (mM): CsCl (145), EGTA (5), HEPES (10), CaCl<sub>2</sub> (3), ATP (2), pH bylo upravováno pomocí CsOH na hodnotu 7,3. Osmolalita intracelulárního roztoku byla 290 mOsm.

Pro stanovení účinku vápenatých iontů byly použity extracelulární roztoky bez a s obsahem vápenatých iontů. Roztok bez vápenatých iontů (ECS-0 Ca<sup>2+</sup>) obsahoval (mM): NaCl (150), HEPES (10) a 2 mM HEDTA. Roztok s obsahem vápenatých iontů (ECS-2 Ca<sup>2+</sup>) obsahoval (mM): NaCl (150), HEPES (10) a 2 mM Ca<sup>2+</sup>.

Roztoky agonistů cinnamaldehydu a allylisothiokyanátu (AITC) byly připravovány vždy před pokusem z 0.1 M zásobního roztoku v DMSO skladovaném v chladu. Měření byla prováděna s roztokem Cin a AITC o celkové koncentraci 100 μM.

Kultivační LB médium (Lysogeny Broth medium) obsahovalo: 1% (w/v) peptonu z kaseinu, 0.5% (w/v) extrakt z kvasinek a 0.26 M NaCl. Složky média byly rozpuštěny v deionizované vodě a směs byla sterilizována při 121°C.

## 6.6 Elektrofyziologická technika patch-clamp

Elektrické proudy z povrchu celých buněk (konfigurace *whole-cell*) byly snímány elektrofyziologickou technikou *patch clamp* obvykle 24 až 48 h po transfekci. Pro každou skupinu pokusů bylo studováno 5 až 8 pozitivních buněk (exprimujících marker GFP) na každém sklíčku z nejméně tří nezávislých transfekcí. *Whole-cell* proudy byly snímány zesilovačem Axopatch 1-D s použitím programu pCLAMP10. K měření byly použity elektrody z borosilikátového skla (o vnitřním průměru 1.1 mm a vnějším průměru 1.6 mm) naplněné intracelulárním roztokem, které po naplnění vykazovaly odpor v rozmezí od 3 do 5 MΩ. Sériový odpor byl obvykle menší než 10 MΩ a byl kompenzován na 60-80%. Pro rychlou aplikaci chemických podnětů byl použit aplikační systém, jehož ústí bylo vzdálené přibližně 100 μm od buňky, na niž byly aplikovány roztoky. Experimenty byly prováděny při pokojové teplotě (22 – 25 °C).

## 6.7 Stimulační protokoly, hodnocení záznamů a statistická analýza

Všechna naměřená data byla analyzována programem Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Pro tvorbu grafů a statistické vyhodnocení byl použit program SigmaPlot 10.0 (Systat Software) a CorelDraw X4 (Corel).

### *Záznam a hodnocení proudově-napěťové charakteristiky, protokol 1*

Napěťová aktivace receptoru TRPA1 byla studována pomocí 100ms napěťových skoků od -80 mV do +200 mV se zvyšující se amplitudou po +20 mV, aplikovaných v kontrolním extracelulárním roztoku. Napěťově závislé parametry aktivace kanálu byly odhadnuty v ustáleném stavu aktivační fáze vždy na konci (~90-100 ms) napěťového pulzu. Z hodnoty průměrné amplitudy membránového proudu ( $I$ ) byla zobrazena závislost na příslušném membránovém potenciálu ( $I/V$ ). Po odhadnutí reverzního potenciálu ( $I(V_{\text{rev}}) = 0$ ) byla z proudových odpovědí kanálu TRPA1 vypočítána vodivost dle vztahu:

$$G = I / (V - V_{\text{rev}}),$$

kde  $I$  je proud,  $V$  značí membránový potenciál a  $V_{\text{rev}}$  je reverzní potenciál. Daná závislost byla v testovaných případech proložena Boltzmannovou funkcí:

$$G = \frac{G_{\text{max}} - G_{\text{min}}}{1 + \exp\left(-\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})\right)} + G_{\text{min}}$$

kde  $G_{\text{max}}$  je teoreticky maximální dosažitelná vodivost,  $G_{\text{min}}$  je teoreticky minimální dosažitelná vodivost,  $z$  je vrátkovací náboj ( $z$  anglického “gating charge”),  $F$  představuje Faradayovu konstantu ( $F = 96\,485$  C/mol),  $V$  je napětí,  $V_{1/2}$  je napětí, při kterém vodivost dosahuje poloviční hodnoty svého maxima,  $R$  je univerzální plynová konstanta ( $R = 8,314$  J/(K·mol)) a  $T$  je absolutní teplota.

### *Záznam a hodnocení chemicky aktivovaných proudů, protokol 2 a protokol 3*

Pro určení chemické citlivosti byl používán standardní protokol, který umožňuje zaznamenat proudové odpovědi TRPA1 kanálů na elektrofilní látky (allyl isothiokyanát – protokol 2, cinnamaldehyd – protokol 3) v prostředí nejprve bez vápenatých iontů, poté v extracelulárním prostředí obsahujícím 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , a to na membránových potenciálech od -80 mV do +80 mV.

Transfekované buňky byly nejdříve omývány kontrolním extracelulárním roztokem (ECS), funkčnost receptorů a kvalita snímání byly ověřeny sérií napěťových pulzů (viz

protokol 1). Následovala 30s aplikace roztoku bez vápenatých iontů (ECS-0 Ca<sup>2+</sup>), přičemž membránový potenciál byl konstantní (-70 mV) po dobu 20 s, poté byl spuštěn záznam, při němž byla buňka stimulována každou vteřinu lineárně se zvyšujícím membránovým potenciálem od -80 mV do +80 mV (1 V/s). V době mezi pulzy byla buňka udržována na membránovém potenciálu 0 mV. Příslušný agonista (100 μM) v ECS-0 Ca<sup>2+</sup> byl aplikován po dobu 40 s a poté odmyt z extracelulárního prostoru roztokem ECS-0 Ca<sup>2+</sup> po dobu 10 s. Účinek vápenatých iontů byl poté testován aplikací extracelulárního roztoku obsahujícího 2 mM Ca<sup>2+</sup> (ECS-2 Ca<sup>2+</sup>).

Hodnoty membránového proudu na -80 mV a +80 mV byly odečteny jako průměrná hodnota v intervalech 2.5-3 ms, respektive 158-160 ms v rámci každého napěťového stimulu. Časový průběh hodnot membránového proudu na kladných a záporných membránových potenciálech byl vyneseno pro každou buňku a po kontrole homogenity dat zprůměrněno.

#### *Statistická analýza*

Průměrné hodnoty uvedené v grafech a v textu jsou vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru,  $n$  = počet buněk. Statistická významnost rozdílů v souborech dat byla stanovena Studentovým t-testem ( $P < 0.05$ ), pokud není uvedeno jinak.

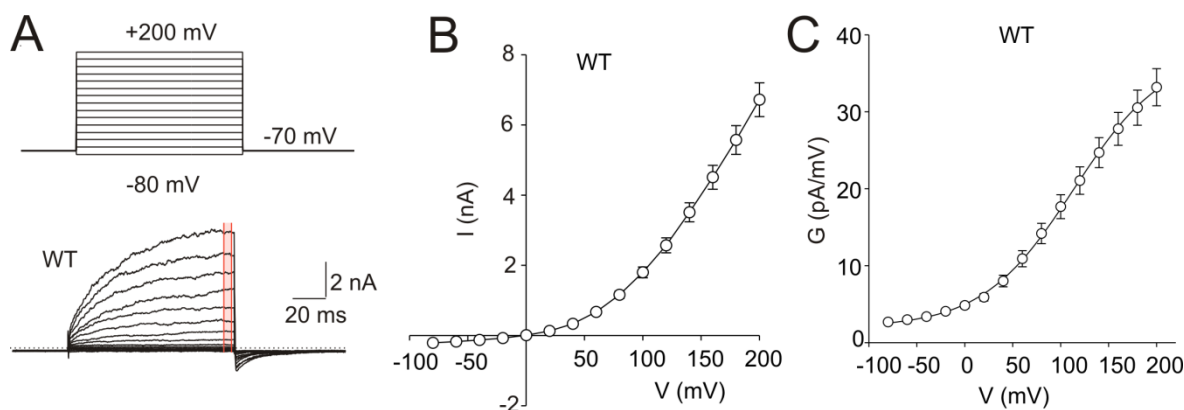
## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Charakterizace aktivačních vlastností divokého typu TRPA1 receptoru

TRPA1 receptor je jen částečně aktivován chemickými látkami, chladem či teplem při klidovém membránovém potenciálu  $-70$  mV. Depolarizace membránového potenciálu má za následek zvýšení aktivity receptoru a při hodnotách membránového potenciálu vyšších než  $+100$  mV jsou TRPA1 proudy zaznamenány i bez přítomnosti agonistů (Story et al., 2003).

#### 7.1.1 Aktivace depolarizačním napětím

Ke studiu funkčních kanálů byl použit protokol zahrnující sérii 100ms-napětových pulzů aplikovaných na buňku v kontrolním extracelulárním roztoku, bez přítomnosti chemických aktivátorů. Aplikace napětových pulzů byla v rozsahu minimální nastavené hodnoty membránového potenciálu  $-80$  mV po maximální hodnotu  $+200$  mV, přičemž mezi pulzy byl membránový potenciál udržován na hodnotě  $-70$  mV (viz kapitola 6.7 a obr. 7A nahoře).



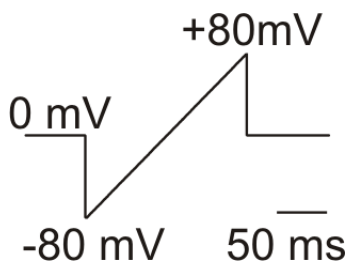
**Obrázek 7:** A) Schéma stimulačního protokolu používaného pro stanovení napětové aktivace divokého typu receptoru TRPA1 a jeho mutantních forem. Nahoře: Protokol zahrnuje sérii napětových pulzů od  $-80$  mV do  $+200$  mV, mezi napětovými pulzy je membránový potenciál udržován na hodnotě  $-70$  mV. Napětové pulzy se od každé předchozí stimulace liší o 20 mV. Celkem je aplikováno 15 vzájemně na sebe navazujících stimulačních pulzů. Dole: Červeně je označena vybraná oblast, ve které byla pro jednotlivé záznamy stimulace odečtena maximální amplituda membránového proudu. B) Průměrná proudově napětová charakteristika TRPA1 kanálu získaná z 81 nezávislých měření. C) Průměrná vodivostní závislost na membránovém napětí vypočtená z jednotlivých záznamů, jejichž průměr je uveden v B).

Průměrné hodnoty membránového proudu jsme odečítali v intervalu mezi ~90-100ms, zobrazovali v závislosti na daném napětí a z proudově-napěťové charakteristiky (I/V) stanovili odhad reverzního potenciálu  $V_{rev}$ . Závislost vodivosti na membránovém napětí (G/V) byla pro každý záznam stanovena přepočtem uvedeným v metodách (kap. 6.7). Získané závislosti G/V byly proloženy teoretickou Boltzmannovou funkcí a pro každou buňku byla stanovena hodnota  $G_{min}$ ,  $G_{max}$ ,  $V_{1/2}$  a  $z$ . Jednotlivé proudově-napěťové a G/V charakteristiky byly zprůměrněny a zobrazeny (obr. 7B a 7C).

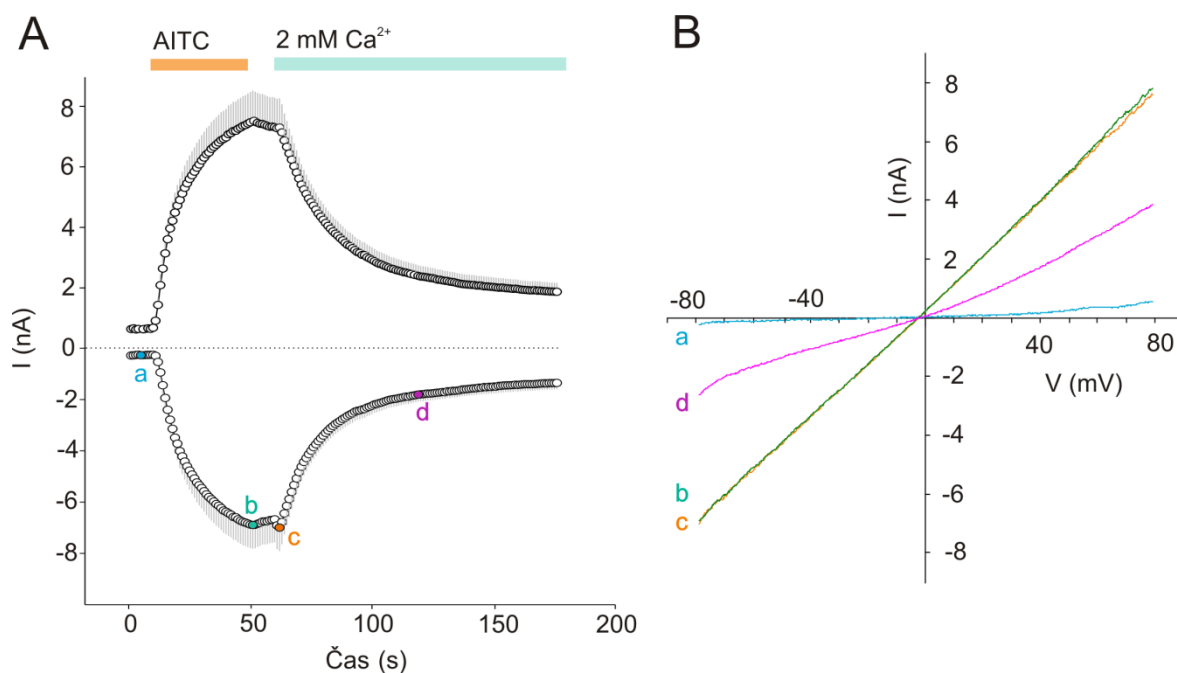
Tato kontrolní série našich pokusů prokázala, že rekombinantní lidský TRPA1 iontový kanál je bez přítomnosti agonistů aktivován depolarizačním napětím, aktivace je charakterizována maximální proudovou odpovědí  $6.7 \pm 0.5$  nA na +200 mV ( $G_{max} = 37.1 \pm 2.6$  nS) a polovičním účinným napětím  $116 \pm 3$  mV ( $n = 81$ ), což je v souladu s předchozími studiemi.

### 7.1.2 Aktivace allyl isothiokyanátem

V kontrolních pokusech byl testován účinek 100  $\mu$ M AITC a vápenatých iontů pomocí protokolu uvedeného v kapitole 6.7 (obr. 8). AITC vyvolávalo na obou membránových potenciálech velké proudy ( $7.5 \pm 1.0$  nA;  $n = 20$ ) a ( $-6.9 \pm 0.9$  nA;  $n = 20$ ), které byly při přidání vápenatých iontů jen přechodně a slabě zvýšeny, což znamená, že aktivační účinek AITC byl téměř maximální (obr. 9). V přítomnosti ECS-2Ca<sup>2+</sup> se odpovědi postupně snižovaly (desenzitizovaly), což je děj nazývaný inaktivace (Wang et al., 2008b). Inaktivace byla popsána časovou konstantou  $T_{50} = 41.7 \pm 5.2$  s na kladném membránovém potenciálu.



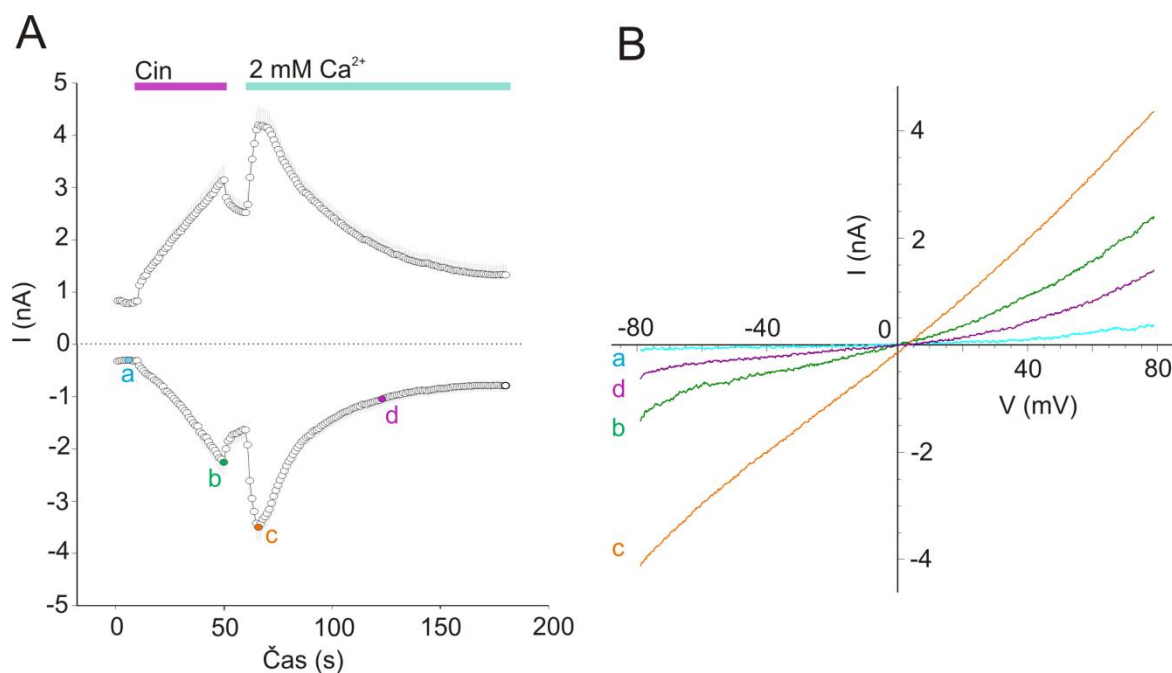
**Obrázek 8: Stimulační protokol 2 pro stanovení chemické citlivosti. Zvýšení membránového potenciálu z -80 mV na +80 mV, opakující se v 1s intervalu.**



**Obrázek 9:** Vliv allyl isothiokyanátu na TRPA1 kanály exprimované v HEK293T buňkách. **A)** Proudové odpovědi iontového kanálu TRPA1 na kladných a záporných hodnotách membránového potenciálu během aplikace aktivčního protokolu 2 ( $n = 20$ ). **B)** Proudově napěťová charakteristika TRPA1 kanálu v časech, vyznačených body v obrázku A. a – iniciační fáze v extracelulárním roztoku bez přítomnosti vápenatých iontů (ECS-0Ca<sup>2+</sup>), b - maximální odpověď na AITC, c – maximální odpověď na Ca<sup>2+</sup>, d – inaktivační fáze v přetrvávající přítomnosti vápenatých iontů (ECS-2Ca<sup>2+</sup>).

### 7.1.3 Aktivace cinnamaldehydem a modulace vápenatými ionty

Pro stanovení potenciačního účinku extracelulárních Ca<sup>2+</sup> byl ustálen protokol, kdy je s výhodou použita aktivace nižší (tj. nižší než poloviční účinné) koncentrace elektrofilního agonisty v prostředí bez vápenatých iontů. Poté je přidán extracelulární roztok obsahující 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Počáteční aktivace receptorů kovalentní modifikací přetrvává i po odmytí agonisty a lze tak sledovat potenciaci a následnou inaktivaci závislou na extracelulárních Ca<sup>2+</sup>, které procházejí aktivovanými kanály do nitra buňky (Wang et al., 2008b; Surá et al., 2012). Poloviční účinná koncentrace (EC<sub>50</sub>) cinnamaldehydu je 61 ± 9 μM (Bandell et al., 2004). V našich pokusech byl aplikován 100 μM Cin za použití protokolu 3 popsaného v metodách (kap. 6.7). Proudová odpověď Cin v ECS-0Ca<sup>2+</sup> dosahovala nižších hodnot, jen 3.1 ± 0.3 nA na +80 mV a -2.2 ± 0.2 nA ( $n = 30$ ) na -80 mV po 40 s aplikace (obr. 10).

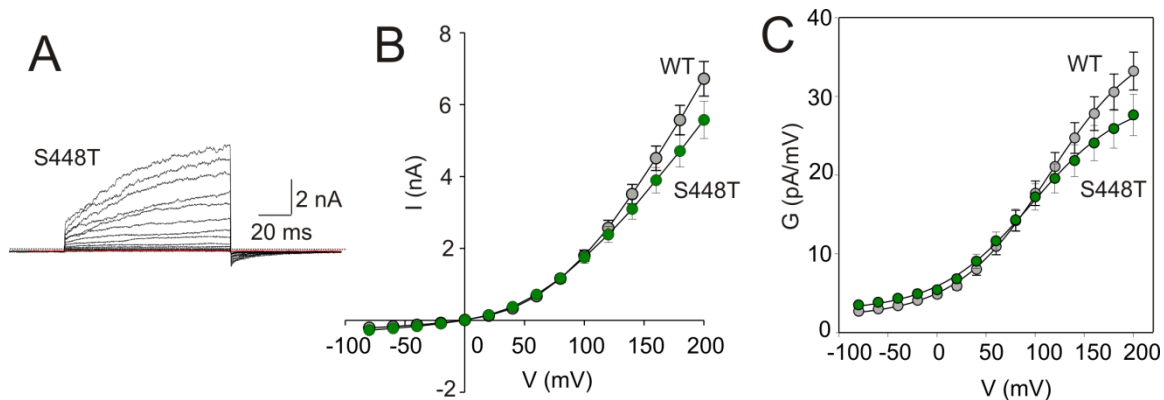


**Obrázek 10: Vliv cinnamaldehydu a vápenatých iontů na TRPA1.** **A)** Proudové odpovědi iontového kanálu TRPA1 na kladných a záporných hodnotách membránového potenciálu během aplikace aktivčního protokolu 2 ( $n = 30$ ). **B)** Proudově napěťová charakteristika TRPA1 kanálu v časech, vyznačených body v obrázku A. a – iniciační fáze v extracelulárním roztoku bez přítomnosti vápenatých iontů (ECS-0Ca<sup>2+</sup>), b- maximální proudová odpověď vyvolaná cinnamaldehydem, c – maximální proudová odpověď vyvolaná vápenatými ionty, d – inaktivační fáze v přetrvávající přítomnosti vápenatých iontů (ECS-2Ca<sup>2+</sup>).

## 7.2 Funkční a strukturální úloha N-konce

### 7.2.1 Specifické mutace v primárním modulu – mutant S448T

Prvním z cílů této diplomové práce bylo nalézt a funkčně ověřit záměnu v některém z T/SPLH motivů, která by mohla významně ovlivnit primární modul ankyrinové domény (ARD). U tetrapeptidového motivu T/SPLH je predikováno, že se významně podílí na strukturální stabilizaci ankyrinových proteinů (Guo et al., 2010). Ve 12. ankyrinové repetici, která je součástí primárního modulu N-konce receptoru TRPA1, byl záměnou serinu za threonin vytvořen mutant S448T. Předpokládali jsme, že touto záměnou dosáhneme posílení konformační stability 12. ankyrinové repetice a s tím spojené vyšší citlivosti na depolarizační napětí a aplikované chemické látky. Pro studium aktivace mutantu S448T byly použity všechny uvedené stimulační protokoly (viz. Metody, kap. 6.7).



**Obrázek 11:** *A) Reprezentativní proudová odpověď S448T zaznamenaná napětovým protokolem 1 při whole-cell konfiguraci. B) Průměrná proudově napěťová charakteristika S448T získaná z 28 nezávislých měření. C) Průměrná vodivostní závislost na membránovém napětí vypočtená z jednotlivých záznamů, jejichž průměr je uveden v panelu B.*

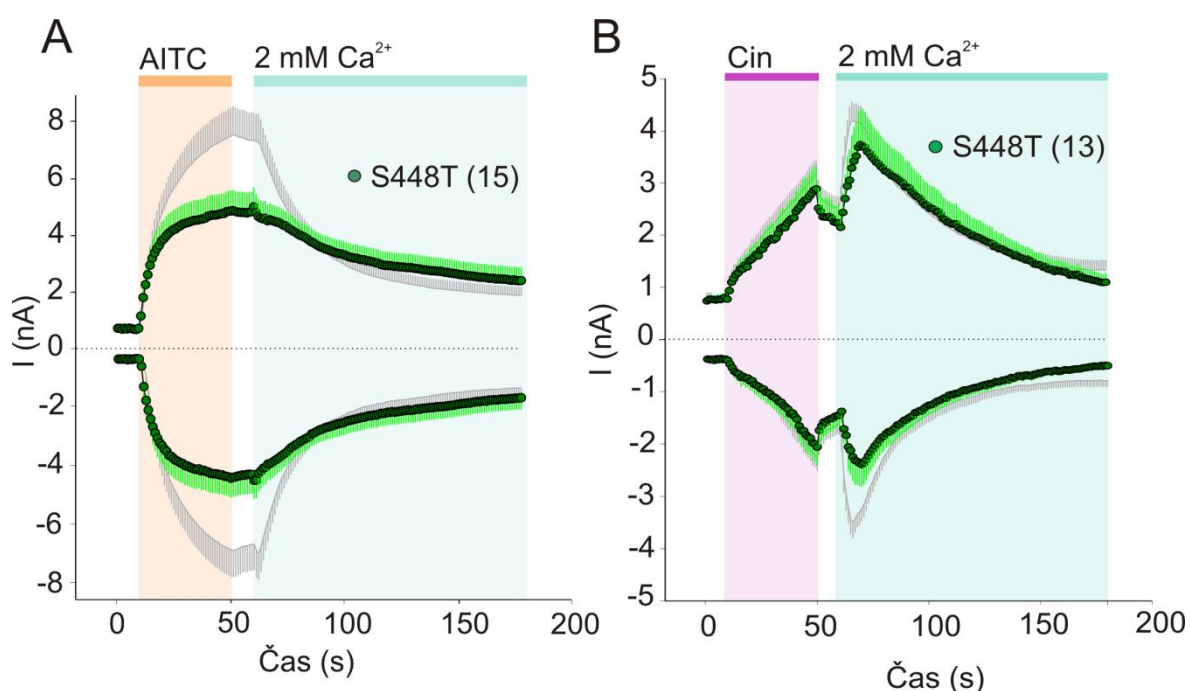
Testovaný soubor měření z HEK293T buněk transfekovaných S448T při aplikaci depolarizačního napětí je charakterizován maximální proudovou odpovědí  $5.6 \pm 0.5$  nA na +200 mV ( $G_{\max} = 30.5 \pm 2.9$  nS) a polovičním účinným napětím  $V_{1/2} = 103.3 \pm 7.2$  mV ( $n = 26$ ) (obr. 11).

#### *S448T – protokol 2*

Pro zjištění citlivosti H244R na plného agonistu AITC byl aplikován stimulační protokol 2. Proudové vyvolané AITC dosahovaly na kladných i záporných hodnotách membránového potenciálu asi polovičních hodnot oproti divokému typu (WT) TRPA1:  $4.9 \pm 0.7$  nA na kladných hodnotách a  $-4.5 \pm 0.7$  nA ( $n = 15$ ) na záporných hodnotách membránového potenciálu. Po přidání extracelulárního roztoku s 2 mM vápenatých iontů (ECS-2  $\text{Ca}^{2+}$ ) byl krátce pozorovatelný potenciační účinek, který byl umocněn předchozí stimulací AITC. Posléze v přetrvávající přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů přecházely proudové odpovědi do inaktivační fáze. Průběh protokolu viz obrázek 12, panel A.



Pro zjištění citlivosti na cinnamaldehyd byl aplikován stimulační protokol 3. Poloviční účinná koncentrace cinnamaldehydu není u lidského TRPA1 (hTRPA1) známa, určena byla pouze pro myší receptor TRPA1, mTRPA1 ( $EC_{50} = 61 \pm 9 \mu\text{M}$ ). Z výsledků předchozích studií i z našich experimentů je však zřejmé, že maximální odpovědi hTRPA1 na  $100 \mu\text{M}$  cinnamaldehyd dosahují v průměru přibližně poloviny maximální odpovědi na AITC. Výsledky ukazují, že oproti divokému typu receptoru (WT) mutant S448T nedosahuje stejně velké odpovědi na cinnamaldehyd ani na vápenaté ionty, ale tento rozdíl není tolik patrný jako v případě proudových odpovědí na AITC. Na záporných hodnotách membránového potenciálu jsou proudy během celého trvání protokolu mírně sníženy, maximální proudová odpověď na cinnamaldehyd byla  $2.9 \pm 0.5 \text{ nA}$  na kladných hodnotách a  $-2.0 \pm 0.3 \text{ nA}$  ( $n = 13$ ) na záporných hodnotách membránového potenciálu. Časový průběh a nástup odpovědi na agonisty zůstal stejný, odpovědi nebyly opožděné, viz obrázek 12, panel B.

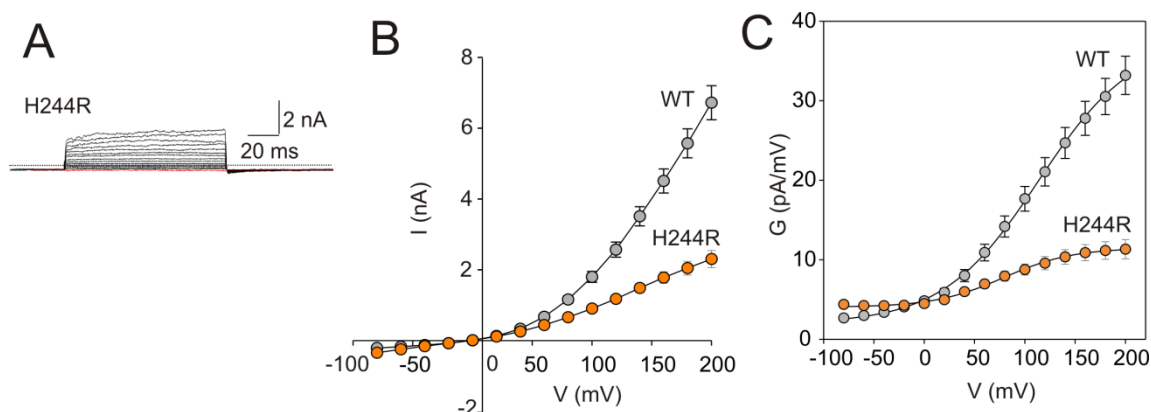


**Obrázek 12:** *A) Záznam membránových proudů mutantu S448T při aplikaci protokolu 2. Doba aplikace je vyznačena horizontální čarou nad záznamy. Průměrné proudové odpovědi vypočítané z jednotlivých měření, kdy je aplikován agonista AITC,  $n = 15$ . B) Záznam proudových odpovědí při aplikaci protokolu 3. Průměrné proudové odpovědi vypočítané z jednotlivých měření, kdy je aplikován agonista cinnamaldehyd,  $n = 13$ .*

## 7.2.2 *Specifické mutace v regulačním modulu – mutant H244R*

Dalším z cílů diplomové práce bylo pomocí bodové mutagenese destabilizovat 6. ankyrinovou repetici a navrhnout možný strukturální význam regulačního modulu pro funkci TRPA1 kanálu. Tetrapeptidový motiv T/SPLH v ankyrinových repeticích má stabilizační funkci v rámci ankyrinové domény receptoru (Guo et al., 2010). V 6. ankyrinové repetici TRPA1 receptoru byla ve funkčním motivu TPLH provedena záměna histidinu za arginin, která měla podpořit destabilizaci proteinu. Pro objasnění funkčních parametrů byly na mutantní kanál H244R aplikovány všechny výše uvedené protokoly (depolarizační napětí, cinnamaldehyd, AITC).

V průběhu aplikace depolarizačního napětí mutant nevykazoval vyšší proudovou aktivitu než divoký typ (WT) TRPA1 (obr. 13). Maximální proudová odpověď mutantu H244R dosahovala  $2.3 \pm 0.2$  nA na +200 mV a poloviční účinné napětí  $V_{1/2} = 77.2 \pm 5$  mV. Průměrná vodivost mutantu byla  $G_{\max} = 12.3 \pm 1.4$  nS ( $n = 23$ ).



**Obrázek 13:** *A) Reprezentativní proudová odpověď H244R zaznamenaná napětovým protokolem 1 při whole-cell konfiguraci B) Průměrná proudově napěťová charakteristika H244R získaná z 25 nezávislých měření. C) Průměrná vodivostní závislost na membránovém napětí vypočtená z jednotlivých záznamů, jejichž průměr je uveden v panelu B.*

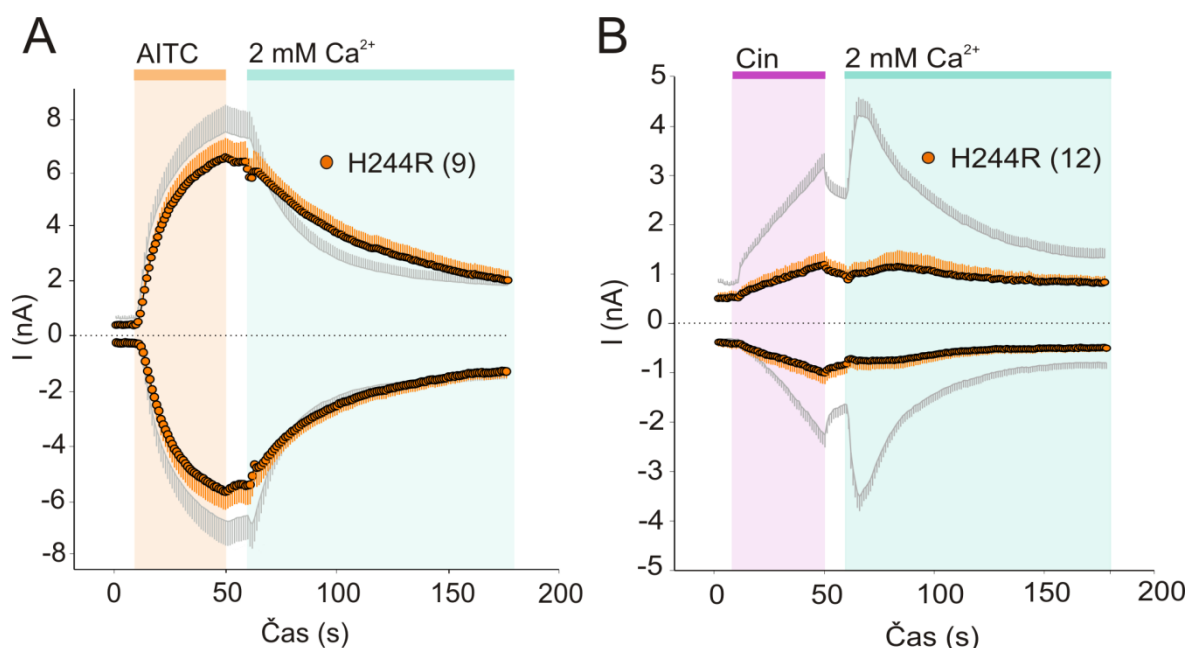
### *H244R – protokol 2*

Na kladném membránovém potenciálu byla výsledná citlivost mutantu v bezvápníkovém roztoku s AITC charakterizována maximální proudovou amplitudou  $6.6 \pm 0.7$  nA a na záporném membránovém potenciálu maximální proudovou amplitudou  $-5.8 \pm 0.7$  nA ( $n = 9$ ). Po odmytí agonisty bezvápníkovým roztokem a následné aplikaci

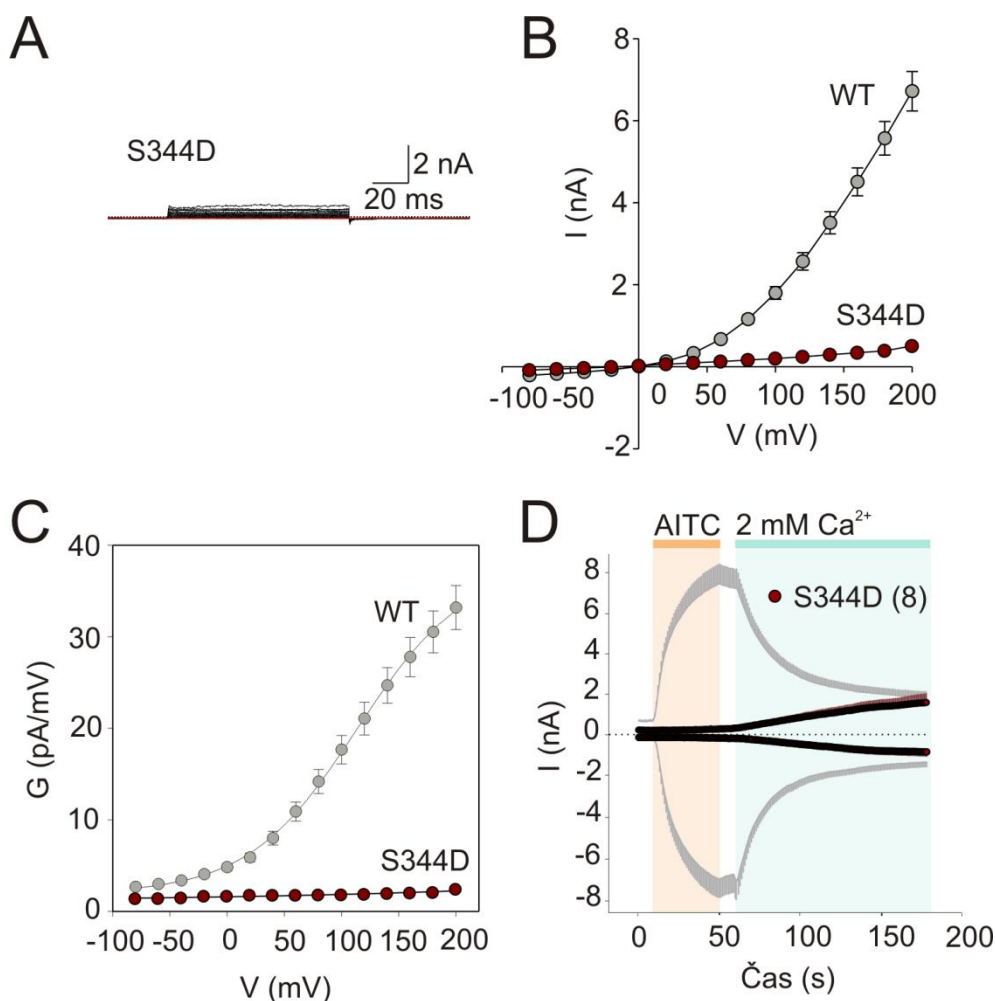
roztoku s 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  již došlo k inaktivaci vlivem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Na kladných hodnotách membránového potenciálu byla inaktivační fáze zpomalená, na záporných hodnotách ke zpomalení inaktivace nedošlo. Časový průběh průměrné proudové odpovědi mutantu H244R je znázorněn na obrázku 14, panel A.

### H244R – protokol 3

Aplikace cinnamaldehydu v roztoku s 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  na H244R nedosahovala ani polovičního účinku cinnamaldehydu na WT. Maximální proudová odpověď byla  $1.2 \pm 0.3$  nA pro kladné hodnoty membránového potenciálu a  $-1 \pm 0.2$  nA ( $n = 12$ ) pro záporné hodnoty membránového potenciálu. Významným zjištěním je malá proudová odpověď na roztok s 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , která není vyšší než proudová odpověď vyvolaná cinnamaldehydem, neboť u WT je potenciace vápenatými ionty vždy umocněna předchozí aplikací cinnamaldehydu. Časový průběh průměrné proudové odpovědi H244R je uveden v porovnání s průměrným záznamem z WT na obrázku 14, panel B.



Obr. 14: **A)** Záznam průměrných odpovědí H244R při aplikaci protokolu 2. Průměrné proudové odpovědi vypočítané z jednotlivých měření, kdy je aplikován agonista AITC,  $n = 9$ . Doba aplikace je vyznačena horizontální čarou nad záznamy. **B)** Záznam průměrných odpovědí H244R při stimulaci buněk protokolem 3. Průměrné proudové odpovědi vypočítané z jednotlivých měření, kdy je aplikován agonista cinnamaldehyd,  $n = 12$ .



**Obrázek 15:** A) Reprezentativní proudová odpověď S344D zaznamenaná napětovým protokolem 1 při whole-cell konfiguraci. B) Průměrná proudově napětová charakteristika S344D získaná ze 6 nezávislých měření. C) Průměrná vodivostní závislost na membránovém napětí vypočtená z jednotlivých záznamů, jejichž průměr je uveden v panelu B. D) Průběh protokolu 2 – AITC. Mutace S344D vyústila v nefunkční fenotyp a nelze určit maximální proudovou aktivitu vyvolanou AITC. Záznam se podobá proudům netransfekované buňky HEK293T (n= 8).

### 7.2.3 Specifické mutace ovlivňující sekundární strukturu ankyrinových repetič – mutant S344D

Reziduum S344 se nachází v 9. ankyrinové repetici, která již není součástí regulačního modulu, ale pravděpodobně jej strukturně silně ovlivňuje. Zároveň je součástí konzervovaného SPxx motivu, jenž je predikován jako fosforylační motiv pro cyklin-dependentní proteinkinázu 5 (CDK 5). Záměnou serinu za aspartát v SPxx motivu je napodoben fosforylovaný stav serinu díky přítomnosti záporného náboje postranního řetězce aspartátu (viz kapitola 7.2.4). Pro zjištění funkčnosti S344D kanálu byl použit napětový protokol 1 a protokol 2 s využitím agonisty AITC. Soubor pokusů na

depolarizační napětí je charakterizován maximální proudovou odpovědí  $0.5 \pm 0.1$  nA na +200 mV ( $n = 6$ ), přičemž hodnota polovičního účinného napětí nebyla stanovena (obr. 15A, B a C).

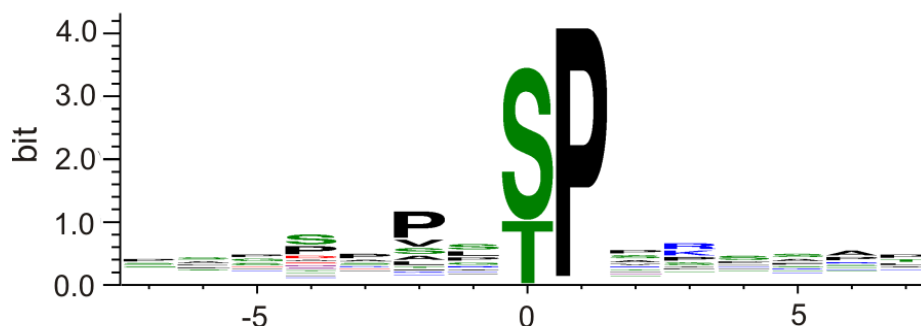
#### *S344D – protokol 2*

U mutace S344D nelze určit maximální proudovou aktivitu vyvolanou AITC, neboť záměna serinu za aspartát vyústila v nefunkční fenotyp kanálu. Záznam proudových odpovědí získaných pomocí protokolu 2 se podobá proudům vyvolaným u nativních (netransfekovaných) HEK 293T buněk (data neuvedena). Časový průběh odpovědi získaných pomocí protokolu 2 je zobrazen na obrázku 15D.

### **7.2.4 *Specifické mutace v sekvenčním motivu pro fosforylaci proteinkinázou CDK5***

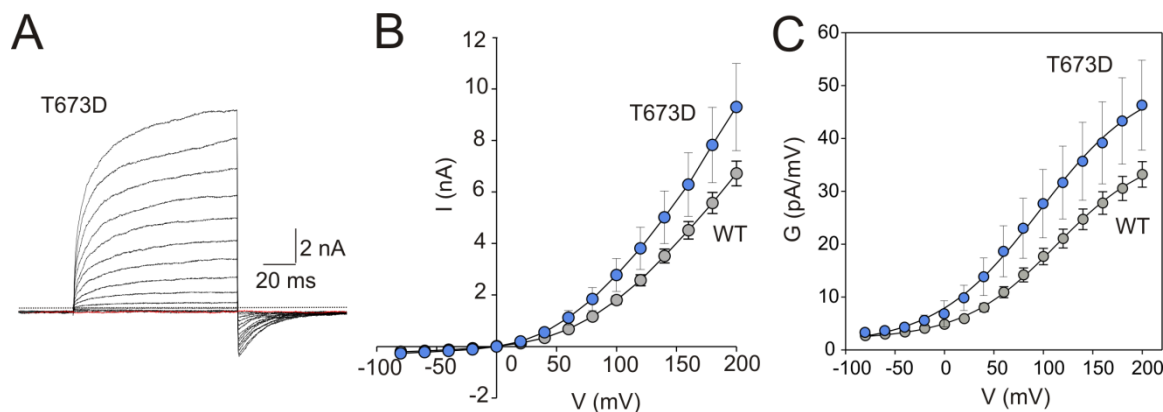
#### *7.2.4.1 Funkční charakteristika mutantu T673D*

Součástí diplomové práce bylo určení možné alternativní úlohy T/SPLH motivu na N-konci jako predikovaného místa pro fosforylaci proteinkinázou CDK5. Dle studie Pareek et al., 2007 cyklin-dependentní kináza 5 (CDK5) moduluje nociceptivní signalizaci přímou fosforylací receptoru TRPV1. Bylo zjištěno, že CDK5 fosforyluje TRPV1 v konsenzuální sekvenci (S / T) PX (K / H / R) (Beaudette et al., 1993; Songyang et al., 1996), kde jsou serin nebo threonin umístěny bezprostředně před zbytkem prolinu a všechna tato rezidua jsou vysoce konzervována (obr. 16). Bylo zjištěno, že CDK5-zprostředkovaná fosforylace konzervovaného T407 může u TRPV1 receptoru modulovat agonistou vyvolaný přísun vápenatých iontů. V souvislosti s předchozí studií byla u TRPA1 receptoru vytvořena mutace T673D ve spojovací oblasti mezi ankyrinovou a transmembránovou doménou. Tato mutace měla za cíl simulovat fosforylovaný stav threoninu.



**Obrázek 16:** Sekvenční motiv pro fosforylaci proteinkinázou CDK5. Posloupnost aminokyselin charakteristická pro fosforylační místo CDK5 kinázou. Velikost písmen, vyjádřená v jednotkách informace (bit), odpovídá pravděpodobnosti výskytu uvedené aminokyseliny na dané pozici. Pro fosforylaci CDK5 je nejpravděpodobnější sekvence aminokyselin (S/T)PX(K/H/R), přičemž prolin na pozici +1 je nezbytný a kladné reziduum na pozici +3 je preferováno.

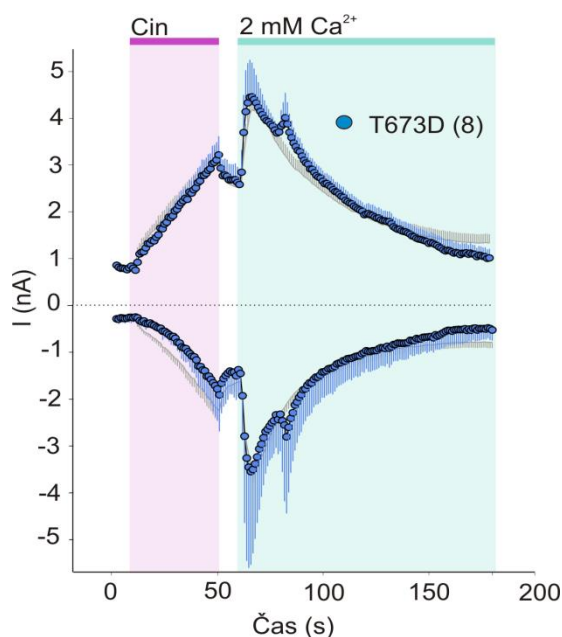
Mutant T673D TRPA1 byl nejprve stimulován napětovým protokolem (obr. 17). Tento soubor pokusů je charakterizován maximální proudovou odpovědí  $9.3 \pm 1.7$  nA na 200 mV ( $G_{\max} = 50.7 \pm 8.6$  nS) a polovičním účinným napětím  $97.1 \pm 15.3$  mV ( $n = 8$ ). Po aplikaci napětového protokolu 1 byl pro mutant T673D použit protokol 3, zahrnující aplikaci roztoku agonisty cinnamaldehydu (100  $\mu$ M) v bezvápníkovém roztoku (obr. 18).



**Obrázek 17:** A) Reprezentativní proudová odpověď T673D zaznamenaná napětovým protokolem 1 při whole-cell konfiguraci B) Průměrná proudově napětová charakteristika T673D získaná z 8 nezávislých měření. C) Průměrná vodivostní závislost na membránovém napětí vypočtená z jednotlivých záznamů, jejichž průměrné hodnoty jsou uvedeny v panelu B.

### T673D – protokol 3

Průměrná maximální proudová odpověď vyvolaná agonistou byla  $3.2 \pm 0.4$  nA pro kladný membránový potenciál a  $-1.9 \pm 0.3$  nA pro záporný membránový potenciál. Mírná proudová aktivace v inaktivační fázi je způsobena opožděnou proudovou odpovědí na vápenaté ionty pozorovanou u některých buněk, což může být důsledkem nižší aktivace na záporných membránových potenciálech.



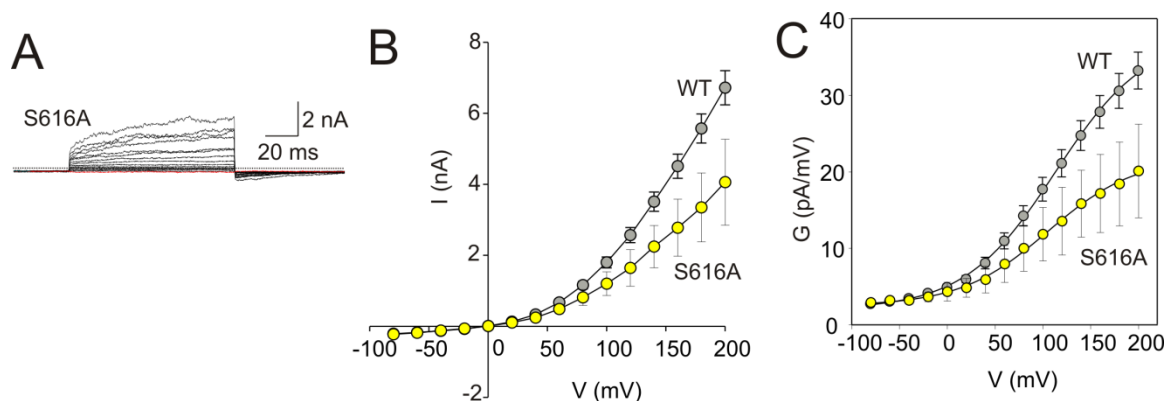
**Obrázek 18:** Časový záznam průměrné proudové odpovědi mutantu T673D na cinnamaldehyd, ( $n = 8$ ).

#### 7.2.4.2 Funkční charakteristika mutantu S616A

Dalším N-koncovým reziduem, které je predikovaným fosforylačním místem pro CDK5, je S616. Dle nejnovější struktury TRPA1 kanálu je reziduum S616 umístěno v tzv. polární kapse, která zahrnuje 16. ankyrinovou doménu a část oblasti helix-otáčka-helix, která je napojena na 16. ankyrinovou doménu, směrem k transmembránové oblasti a tzv. TRP-doméně (Paulsen et al., 2015). Tento aminokyselinový zbytek se nachází poblíž reaktivního cysteinu 621, který přispívá k citlivosti TRPA1 na elektrofilní látky. Zvolili jsme proto konzervativní záměnu S616A, abychom ověřili, zda narušení případného fosforylačního motivu ovlivní funkci TRPA1.

Pro ověření funkčnosti mutovaného kanálu byl použit napěťový protokol a stimulační protokol 3, který ověřuje chemickou citlivost na agonistu cinnamaldehyd. Soubor pokusů na buňkách HEK293T přechodně transfekovaných mutantem S616A

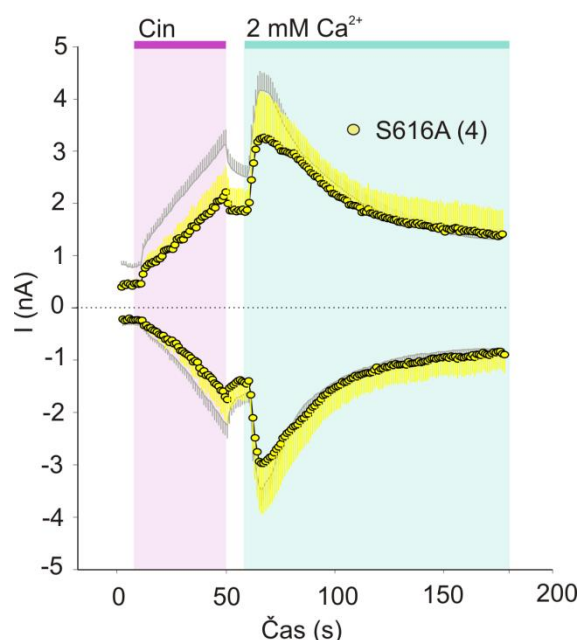
testovaných na citlivost k depolarizačnímu napětí je charakterizován maximální proudovou odpovědí  $4.0 \pm 1.2$  nA na +200 mV ( $G_{\max} = 21.6 \pm 7$  nS) a polovičním účinným napětím  $V_{1/2} = 103.4 \pm 13.7$  mV ( $n = 4$ ) (obr. 19).



**Obrázek 19:** *A)* Reprezentativní proudová odpověď S616A zaznamenaná napětovým protokolem 1 při whole-cell konfiguraci. *B)* Průměrná proudově napětová charakteristika S616A získaná ze 4 nezávislých měření. *C)* Průměrná vodivostní závislost na membránovém napětí vypočtená z jednotlivých záznamů, jejichž průměrné hodnoty jsou uvedeny v panelu B.

### S616A – protokol 3

Chemická citlivost na cinnamaldehyd byla ověřena stimulačním protokolem 3. Maximální proudová odpověď vyvolaná cinnamaldehydem na membránovém potenciálu +80 mV je  $2.2 \pm 0.5$  nA a na záporných hodnotách membránového potenciálu  $-1.9 \pm 0.3$  nA. Na +80 mV je maximální odpověď na cinnamaldehyd signifikantně nižší oproti divokému typu (WT) TRPA1. Průměrné odpovědi získané ze záznamů z mutovaného kanálu S616A jsou zobrazeny na obrázku 20.



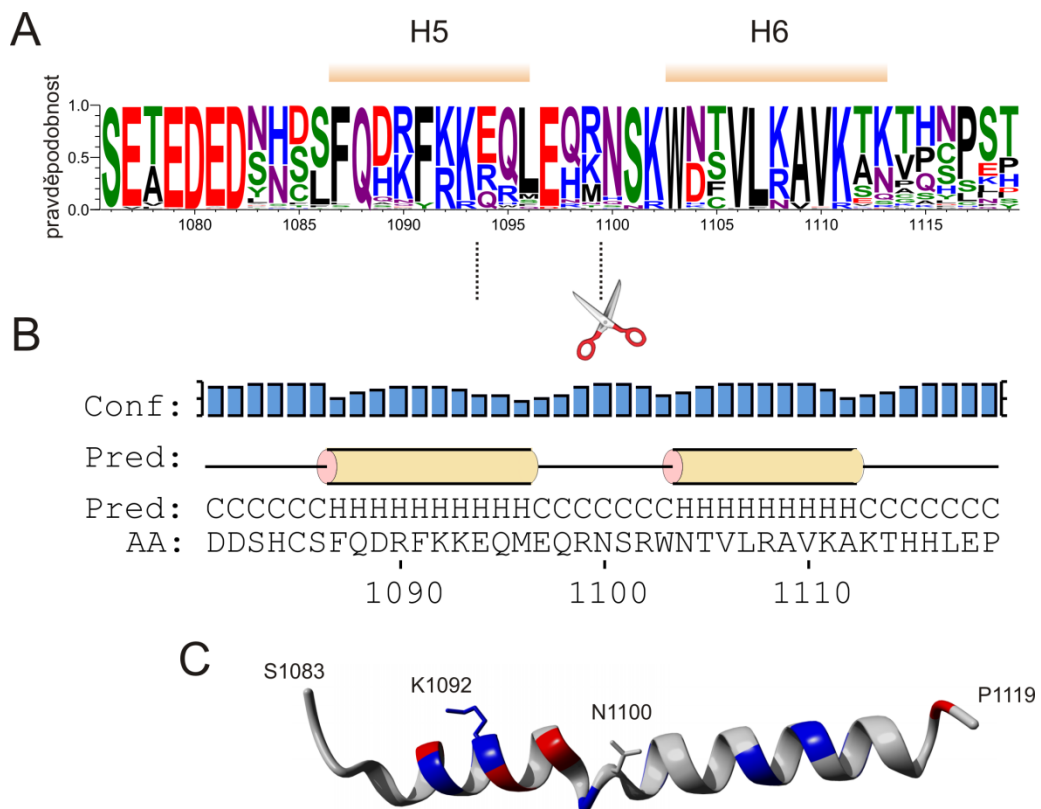
**Obrázek 20:** Záznam průměrných proudových odpovědí mutantu S616A při stimulaci protokolem 3. Průměrná proudová odpověď mutantu S616A vyvolaná agonistou cinnamaldehydem ( $n = 4$ ).



## 7.3 Funkční a strukturální úloha C-konce

### 7.3.1 Úloha distální části C-konce v inaktivaci

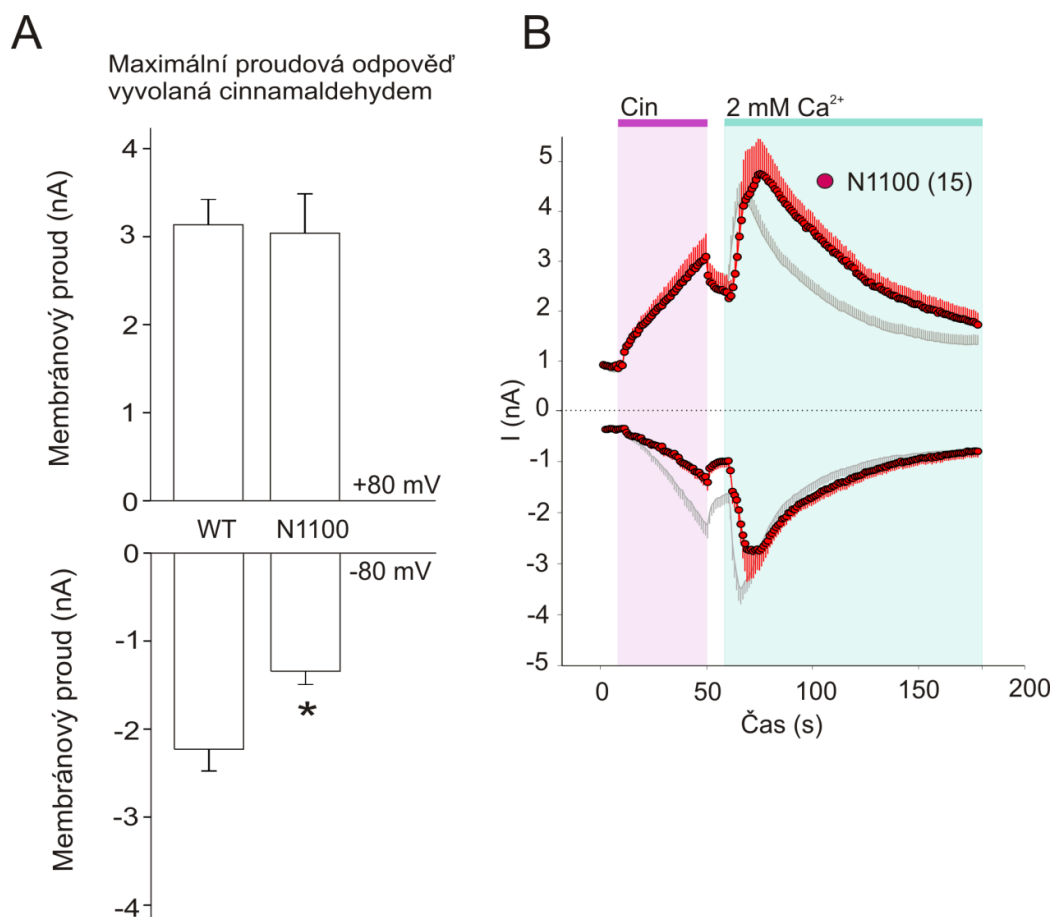
Posledním cílem předložené diplomové práce bylo ověřit, zda se distální část C-konce podílí na regulaci TRPA1 receptoru vápenatými ionty. Dřívější studií bylo zjištěno, že zkrácení cytoplazmatického C-konce TRPA1 o 20 aminokyselin zpomalí Ca<sup>2+</sup>-závislou inaktivaci bez ovlivnění ostatních funkčních parametrů (Surá et al., 2012). Zkrácení C-konce o 26 aminokyselin vedlo k vytvoření nefunkčních kanálů. Pro ověření výsledků z uvedené studie jsme snímali membránové proudy mutantního receptoru TRPA1 zkráceného o 20 aminokyselin (N1100stop) aktivované depolarizací membránového potenciálu a aplikací cinnamaldehydu.



**Obrázek 21: Predikovaná primární a sekundární struktura C-konce TRPA1 receptoru.**

**A)** Sekvence aminokyselin v distální části C-konce. Nahoře je vyznačená predikovaná sekundární struktura v podobě dvou helixů. Nůžky symbolizují místo, kde byla přerušena primární sekvence a C-konec zkrácen o posledních 20 aminokyselin. **B)** Výsledek predikční analýzy distální části C-konce z predikčního serveru PSIPRED. Conf je důvěryhodnost predikční analýzy (0 = nízká, 9 = vysoká), Pred značí predikovanou sekundární strukturu (H = helix, C = smyčka), AA je označení pro výslednou aminokyselinu. **C)** Předpokládaná sekundární struktura hTRPA1 podle programu I-TASSER vyznačuje uspořádání distální části C-konce do dvou helixů. Zkrácením C-konce od rezidua N1100 byl odstraněn helix H6.

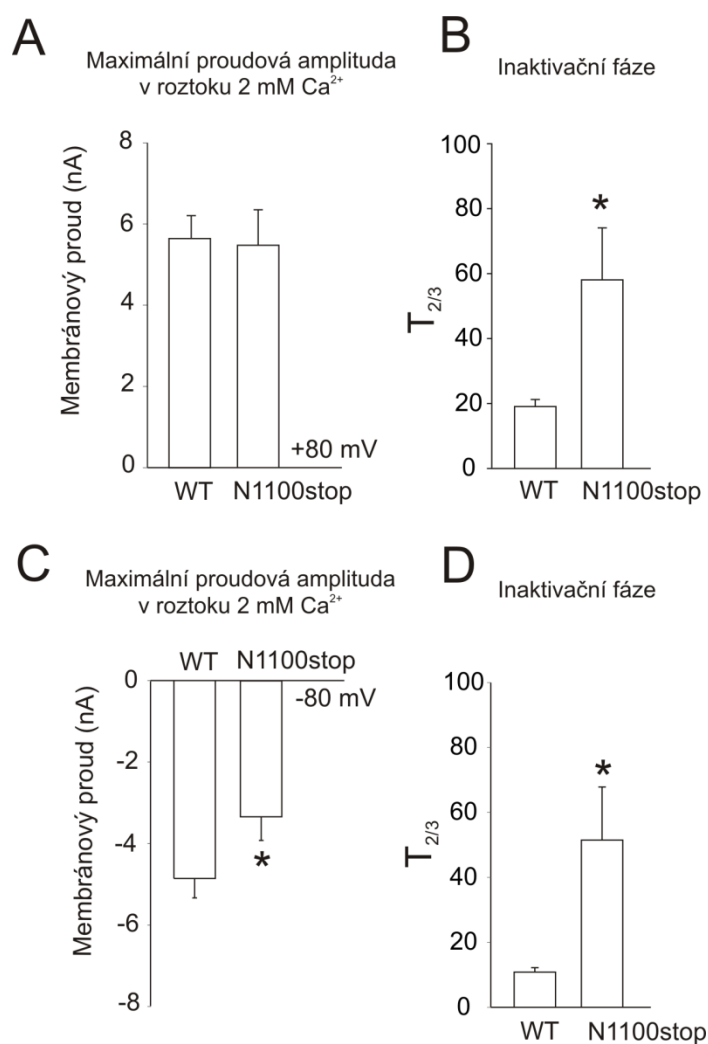
Maximální proudová amplituda odpovědi vyvolaných agonistou (cinnamaldehyd 100  $\mu\text{M}$ ) na +80 mV nebyla statisticky významně odlišná od divokého typu (obr. 22 A). Naproti tomu na záporných hodnotách membránového potenciálu (-80 mV) dosahovala průměrná maximální proudová odpověď jen poloviční hodnoty v porovnání s maximální proudovou odpovědí na +80 mV. V roztoku 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , aplikovaném po dobu 60 s, byla maximální proudová odpověď na membránovém potenciálu -80 mV nižší než u divokého typu.



**Obrázek 22:** **A)** Maximální proudová amplituda odpovědi na cinnamaldehyd na +80 mV a -80 mV pro WT a mutant N1100stop. Na membránovém potenciálu +80 mV se maximální proudová odpověď na cinnamaldehyd v bezvápníkovém roztoku významně neliší. WT =  $3.1 \pm 0.3$  nA,  $n=30$ ; N1100stop =  $3.0 \pm 0.4$  nA,  $n=15$ . Maximální proudová amplituda vyvolaná cinnamaldehydem na záporném membránovém potenciálu -80 mV byla WT =  $-2.2 \pm 0.2$  nA,  $n=30$ , N1100stop =  $1.3 \pm 0.2$  nA,  $n=15$ ,  $P < 0.05$ . **B)** Časový průběh průměrných odpovědí mutantu N1100stop při stimulaci protokolem 3.

Rychlost inaktivace vyvolané zvýšením koncentrace extracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  na hodnotu 2 mM byla charakterizována hodnotou  $T_{2/3}$ , která určuje, za jakou dobu klesne maximální proudová odpověď o jednu třetinu. Inaktivace vyvolaná  $\text{Ca}^{2+}$  byla na obou

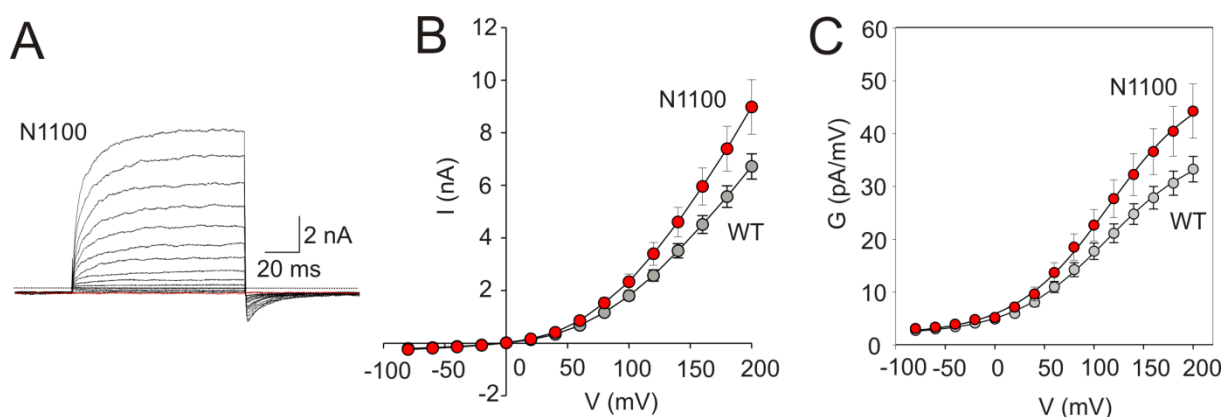
membránových potenciálech výrazně pomalejší než v případě divokého typu TRPA1 receptoru (obrázek 23, panely B, D). Tyto výsledky potvrzují předchozí pozorování, a navíc ukazují, že zpomalení inaktivace může být důsledkem celkově nižších odpovědí N1100stop mutantního kanálu na negativních membránových potenciálech (nižší aktivace brání vstupu vápenatých iontů do nitra kanálu) (obrázek 23A).



**Obrázek 23:** **A)** Maximální proudová amplituda v 2 mM Ca<sup>2+</sup> roztoku u WT a mutantu N1100stop na kladném membránovém potenciálu (+80 mV). WT = 5.7 ± 0.5 nA, n = 33; N1100stop = 5.5 ± 0.9 nA, n = 15. **B)** T<sub>2/3</sub> – rozdíl inaktivační fáze WT a mutantu N1100stop na kladných hodnotách membránového potenciálu. WT = 19 ± 2.2, n=32; N1100stop = 58 ± 16, n = 15; P<0,05 (0,002). **C)** Maximální proudová amplituda v 2 mM Ca<sup>2+</sup> roztoku u WT a mutantu N1100stop na záporném membránovém potenciálu (-80 mV). WT = -4.9 ± 0.5 nA, n = 33; N1100stop = -3.3 ± 0.6 nA, n = 15; P<0,05. **D)** T<sub>2/3</sub> – rozdíl inaktivační fáze WT a mutantu N1100stop na záporném membránovém potenciálu. WT = 10,8 ± 1,3, n = 32; N1100stop = 51,5 ± 16,3, n = 15; P<0,05.

### 7.3.2 Aktivace mutantu N1100stop depolarizačním napětím

Výsledky popsané v předchozí kapitole naznačily, že zkrácení C konce o 20 aminokyselin může způsobit změny v napěťové regulaci TRPA1 kanálu. Testovali jsme proto proudově-napěťovou charakteristiku zkráceného TRPA1 receptoru N1100stop za použití protokolu 1, viz kapitola 6.7. Maximální proudová odpověď mutantu N1100stop byla  $9 \pm 1$  nA na +200 mV ( $G_{\max} = 52.9 \pm 7.7$  nS) s polovičním účinným napětím  $V_{1/2} = 117.5 \pm 7$  mV ( $n=18$ ) (obr. 24).



**Obrázek 24:** A) Reprezentativní proudová odpověď mutantu N1100stop zaznamenaná napěťovým protokolem 1 při whole-cell konfiguraci B) Průměrná proudově napěťová charakteristika N1100stop získaná z 18 nezávislých měření. C) Průměrná vodivostní závislost na membránovém napětí vypočtená z jednotlivých záznamů, jejichž průměrné hodnoty jsou uvedeny v panelu B.

## 8 DISKUZE

Podařilo se nám experimentálně potvrdit základní funkční vlastnosti divokého typu TRPA1 receptoru exprimovaného v HEK293T buňkách. Aktivační parametry získané v našich kontrolních experimentech jsou ve velmi dobré shodě s předchozími údaji uvedenými jak v literatuře, tak s parametry získanými v laboratoři, kde byla diplomová práce vypracována. Průměrná hodnota maximální amplitudy při aktivaci TRPA1 depolarizujícím napětím (+200 mV) byla  $\sim 6.5$  nA, přičemž zjištěné poloviční účinné napětí bylo 116 mV. Proudové odpovědi vyvolané 40s aplikací cinnamaldehydu ( $3.1 \pm 0.3$  nA na +80 mV) byly senzitivovány přidáním 2 mM extracelulární koncentrace vápenatých iontů až na hodnotu  $5.7 \pm 0.5$  nA. Maximální proudové odpovědi zprostředkované WT TRPA1 bylo dosaženo při 40s aplikaci AITC na +80 mV ( $7.5 \pm 1.0$  nA).

### S448T

Dvanáctá ankyrinová repetice (AR) je součástí primárního modulu a zároveň místem, kam se podle některých studií přímo navazují vápenaté ionty (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007). Predikovaný vysoce konzervovaný konsenzuální motiv SPLH ve 12. ankyrinové doméně se nachází v jejím začátku a pravděpodobně silně interaguje se sousedními ankyrinovými repeticemi hustou sítí vodíkových můstků. Sousední ankyrinové repetice 11 a 13 obsahují konzervovaný TPLH motiv, proto byla vytvořena mutace S448T, kde byl serin zaměněn za treonin. Jedná se o konzervovanou záměnu, která měla objasnit, které reziduum se na pozici S448 více uplatňuje ve vzájemné interakci s ostatními doménami a zda prostřednictvím TPLH motivu dojde ke stabilizaci ankyrinové domény. Chemická citlivost S448T na AITC byla jednoznačně nižší na kladných i záporných membránových potenciálech, což neprokazuje, že by treonin podpořil vzájemné interakce se sousedními doménami. Touto konzervativní záměnou byla potvrzena naše hypotéza, podle které je vysoce konzervovaný tetrapeptidový motiv strukturálně důležitý pro funkci receptoru a záměna za jinou aminokyselinu pravděpodobně ovlivní strukturální stabilitu 12. AR. Snížena byla i citlivost na vápenaté ionty, což naznačuje, že se narušily některé vazby s okolními ankyrinovými repeticemi. Možným vysvětlením je, že převládající místo  $\text{Ca}^{2+}$ -závislé inaktivace v 11. ankyrinové repetici je touto mutací ovlivněno prostřednictvím pozměněné funkce 12. ankyrinové repetice, neboť obě se vyskytují v primárním modulu ankyrinové domény.

## H244R

Již dříve bylo zjištěno, že záměna některých histidinových reziduí v rámci motivu TPLH může přispívat ke ztrátě funkční exprese (Hu et al., 2009). To může být způsobeno destabilizací proteinu, protože histidin v TPLH motivu je zaměněn za prostorově výraznější molekulu argininu. Arginin může narušit interakce v rámci T/SPLH motivu, především se serinem nebo treoninem. Mutant H244R vykazoval nižší citlivost na depolarizační napětí, neboť průměrná amplituda na +200 mV byla oproti WT TRPA1 3krát nižší. Také citlivost k cinnamaldehydu byla výrazně snížena a odpovědi na zvýšení extracelulární koncentrace vápenatých iontů nebyly patrné. Velmi překvapivým byl proto náález, že při aplikaci AITC se maximální proudová odpověď H244R mutantu blížila k hodnotě maximální proudové odpovědi divokého typu na obou membránových potenciálech (obr. 14A). Proudová odpověď vyvolaná AITC u mutace H244R byla dokonce vyšší než u mutantu S448T, u kterého bylo předvídáno, že konzervativní záměna v rámci T/SPLH motivu nezpůsobí výraznější změny chemické citlivosti kanálu TRPA1. Tento náález podporuje hypotézu, že elektrofilní agonisté cinnamaldehyd a AITC mají odlišné mechanismy působení, přičemž záměnou H244R byly vazba agonisty AITC na receptor a převod chemického signálu na otvírání iontového kanálu zachovány. Výrazné snížení napěťové citlivosti H244R může souviset s vyšší synergickou závislostí účinku cinnamaldehydu na molekulárním mechanismu napěťové aktivace TRPA1.

## S344D

Mutace S344D byla v našich experimentálních podmínkách zcela necitlivá na napěťové a chemické podněty. Tento výsledek naznačuje, že reziduum S344 nepředstavuje potenciální místo pro fosforylaci, která by se uplatňovala v senzitivaci TRPA1 receptoru. Vzhledem ke specifické lokalizaci tohoto aminokyselinového zbytku v charakteristickém konsenzuálním motivu ankyrinové repetice předpokládáme, že mutace narušila strukturu proteinu, nebo zabránila funkční povrchové expresi TRPA1 receptoru. Stále ještě není prokázáno, jakou úlohu hraje 9. ankyrinová repetice, neboť není součástí regulačního ani primárního modulu. Na základě našich výsledků proto nevylučujeme možnost významného ovlivnění jednoho, či obou funkčních modulů.

## T673D

Vlastnosti mutantního receptoru T673D byly testovány z hlediska možné alternativní úlohy T/SPLH motivu na N-konci jako predikovaného místa pro fosforylaci cyklin-dependentní proteinkinázou 5 (CDK5; fosforylační motiv (S/T)PX(K/H/R)). Přesná struktura N-terminální oblasti obsahující reziduum T673 není dosud známa a ani nejnovější kryo-elektronmikroskopická struktura TRPA1, která byla publikována v průběhu sepisování této diplomové práce, neuvádí sekundární strukturu této oblasti. Z této struktury je však patrné, že T673 je lokalizován ve flexibilní klíčce, která spojuje oblast beta-skládaného listu s oblastí helix-otáčka-helix 2 předcházející 1. transmembránové doméně. O úloze T673 v převodu napětových a chemických podnětů můžeme jen nepřímo uvažovat na základě našich současných znalostí a funkčních studií. Naše výsledky ukázaly, že mutant T673D vykazuje mírné změny v citlivosti na depolarizační napětí oproti divokému typu (WT) TRPA1, zatímco v chemické citlivosti se od něj příliš neliší. Je proto možné, že treonin na pozici 673 představuje potenciální místo pro fosforylaci. Záměny za aminokyselinové zbytky s odlišnými biofyzikálními vlastnostmi by mohly vést k upřesnění funkční úlohy tohoto rezidua.

## S616A

Dle nejnovější struktury TRPA1 kanálu (Paulsen et al., 2015) je reziduum S616 umístěno v tzv. polární kapse, která zahrnuje 16. ankyrinovou doménu a část oblasti helix-otáčka-helix 1, která je napojena na 16. ankyrinovou doménu, směrem k transmembránové oblasti a tzv. TRP-doméně. Uvnitř této kapsy se nachází také významný cystein C621, který se uplatňuje při vazbě elektrofilních látek na receptor. Průměrná proudová amplituda vyvolaná cinnamaldehydem u mutantu S616A byla oproti divokému typu (WT) receptoru TRPA1 signifikantně snížena. Záměna serinu za alanin tak mohla zrušit vzájemné interakce s rezidui H585, H614, N615, které jsou též umístěny v 16. ankyrinové doméně, a s reziduem P617, které již spadá do oblasti helix-otáčka-helix 1, navazující na 16. ankyrinovou doménu. Vzhledem k orientaci S616 není vyloučené, že tento aminokyselinový zbytek může představovat fosforylační místo, kterým je regulován převod z místa chemické kovalentní modifikace do oblasti vnitřního vrátkovacího mechanismu kanálu.

## N1100stop

U mutantního kanálu N1100stop, ve kterém byl zkrácen karboxylový konec o 20 aminokyselin, jsme porovnávali napěťovou citlivost a chemickou citlivost na cinnamaldehyd (100 $\mu$ M po 40 s) v prostředí bez vápenatých iontů a poté v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Zjistili jsme, že maximální vodivost při depolarizaci na +200 mV je u tohoto mutantu signifikantně zvýšena. Předchozí studie Surá et al., 2012 uvádí, že N1100stop mutant měl na kladných membránových potenciálech zpomalenou inaktivaci, pro niž byla vypočítána hodnota  $T_{50} = 89.0 \pm 18.4$  s. Naše výsledky potvrzují zpomalený průběh inaktivační fáze na kladných potenciálech v porovnání s divokým typem TRPA1. Při kvantifikaci výsledků však nebylo možné porovnat námi zjištěné hodnoty s výslednou hodnotou  $T_{50}$  mutantu N1100stop uvedenou ve studii Surá et al., 2012, neboť u několika měření jednotlivých buněk nebylo dosaženo poloviční hodnoty inaktivační fáze po dobu záznamu. Pro porovnání rychlosti inaktivace byla proto zvolena hodnota  $T_{2/3}$ , která udává, za jakou dobu klesne maximální proudová odpověď o jednu třetinu.  $T_{2/3}$  na kladných hodnotách membránového potenciálu byla  $T_{2/3} = 58 \pm 16$  s,  $n = 15$ , což teoreticky odpovídá hodnotě  $T_{50} = \sim 100$  s a je ve velmi dobrém souladu s dříve publikovanými hodnotami ( $89.0 \pm 18.4$  s). Pozoruhodným novým výsledkem bylo, že na záporných hodnotách membránového potenciálu nedosahovala maximální proudová amplituda takových hodnot jako na kladném membránovém potenciálu a proudové odpovědi při chemické stimulaci byly oproti WT statisticky významně sníženy. Inaktivační fáze na membránovém potenciálu -80 mV byla rovněž pomalejší než u divokého typu TRPA1. Z těchto výsledků je pravděpodobné, že distální C-konec se podílí na stavově závislé napěťové regulaci TRPA1. Jeho odstranění zvyšuje proudy aktivované depolarizací, aniž by signifikantně měnilo poloviční účinné napětí. Naproti tomu odpovědi na chemické podněty jsou nižší na záporných membránových potenciálech. Přestože by bylo zapotřebí dalších experimentů, které by měly tuto hypotézu prověřit, lze se domnívat, že zpomalení inaktivace zkráceného mutantu může být odrazem snížené aktivace kanálu na záporných membránových potenciálech. Naše výsledky tak potvrzují, že distální C-konec je kritickou modulační doménou TRPA1 zasahující do jeho Ca<sup>2+</sup>-závislé inaktivace. Nejnovější struktura TRPA1 naznačuje, že distální oblast C-konce je v těsné blízkosti N-koncové 12. ankyrinové repetice, která obsahuje tzv. EF-hand motiv vázající vápenaté ionty (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007; Paulsen et al., 2015), což by mohlo vysvětlit rozdílné výsledky získané v různých laboratořích.



## 9 ZÁVĚR

Výsledky předložené diplomové práce přinášejí nové poznatky, které přispívají k objasnění úlohy aminového i karboxylového konce lidského ankyrinového TRPA1 receptoru. Pomocí elektrofyziologických a molekulárně biologických technik jsme charakterizovali membránové proudy zprostředkované rekombinantním TRPA1 receptorem, vyvolané depolarizujícím napětím, elektrofilními látkami a zvýšením extracelulární koncentrace vápenatých iontů. Podařilo se nám nalézt a funkčně charakterizovat kritické aminokyselinové zbytky, které jsou součástí T/SPLH motivů v důležitých oblastech primárního modulu ankyrinové domény. Navrhli jsme možný strukturální význam regulačního modulu pro funkci TRPA1 kanálu na základě destabilizující mutace v 6. ankyrinové repetici. Specifické aminokyselinové záměny napomohly určit možnou úlohu vytipovaných T/SPLH motivů na N-konci jako predikovaného místa pro fosforylaci TRPA1 proteinu. Potvrdili jsme, že distální část C-konce se podílí na regulaci TRPA1 vápenatými ionty a určili funkční parametry, které jsou ovlivněny odstraněním této distální části proteinu.

Ve zcela nedávné době byla publikována struktura lidského TRPA1 kanálu v rozlišení 4 Å, což svědčí o mimořádném zájmu o tento iontový kanál, který je jednou z důležitých molekul účastnících se převodu bolestivých podnětů a přispívajících ke vzniku zánětlivých procesů a pruritu. Popis struktur TRPA1 bez elektrofilního agonisty, s AITC a se dvěma různými specifickými inhibitory (Paulsen et al., 2015) přinesl důležité informace o TRPA1 jako farmakologickém cíli. Vzhledem k tomu, že ve všech čtyřech popsáných strukturách je pór iontového kanálu uzavřený, tato studie příliš nenapověděla o možných konformačních změnách, které mohou zodpovídat za modulaci napětím, elektrofilními látkami a vápenatými ionty. Oproti předchozím strukturním studiím bylo překvapivé i zjištění přímé interakce aminového a karboxylového konce. Ukazuje se, že úlohu cytoplazmatických konců v aktivaci a modulaci TRPA1 bude nezbytné zjišťovat i nadále kombinací strukturních a intenzivních funkčních studií. Výsledky předložené práce jsou jedním z příspěvků na očekávané cestě k plnému pochopení funkce tohoto alosterického proteinu.

## **10 SEZNAM LITERATURY**

- Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM (Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol* 583:175-193.2007).
- Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, Bucher B, Galzi JL, Sterner O, Bevan S, Hogestatt ED, Zygmunt PM (TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Nat Commun* 2:551.2011).
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S (Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8374-8379.2009).
- Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB (TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacology and Therapeutics* 133:189-204.2012).
- Avelino A, Cruz F (TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373:287-299.2006).
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41:849-857.2004).
- Banke TG (The dilated TRPA1 channel pore state is blocked by amiloride and analogues. *Brain Res* 1381:21-30.2011).
- Banke TG, Chaplan SR, Wickenden AD (Dynamic changes in the TRPA1 selectivity filter lead to progressive but reversible pore dilation. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C1457-1468.2010).
- Baraldi PG, Preti D, Materazzi S, Geppetti P (Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *J Med Chem* 53:5085-5107.2010).
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.2009).
- Basbaum AI, Woolf CJ (Pain. *Curr Biol* 9:R429-431.1999).
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D (TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269-1282.2006).
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM (Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12248-12252.2005).
- Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M (TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol* 75:181-200.2013).
- Beaudette KN, Lew J, Wang JH (Substrate specificity characterization of a cdc2-like protein kinase purified from bovine brain. *J Biol Chem* 268:20825-20830.1993).
- Binder A, May D, Baron R, Maier C, Tolle TR, Treede RD, Berthele A, Faltraco F, Flor H, Gierthmuhlen J, Haenisch S, Hugel V, Magerl W, Maihofner C, Richter H, Rolke R, Scherens A, Uceyler N, Ufer M, Wasner G, Zhu J, Cascorbi I (Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS One* 6:e17387.2011).
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.2000).

- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.1999).
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.1997).
- Cavanaugh EJ, Simkin D, Kim D (Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca(2+) reveals different functional channel states. *Neuroscience* 154:1467-1476.2008).
- Clapham DE (TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524.2003).
- Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D (Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:E1184-1191.2011).
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS (TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432:723-730.2004).
- Cvetkov TL, Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY (Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry* 286:38168-38176.2011).
- del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours M, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM (TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *Journal of Neuroscience* 30:15165-15174.2010).
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K (Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1250-1252.2001).
- Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW (Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274:C1429-1452.1998).
- Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH (Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem* 282:13180-13189.2007).
- Doihara H, Nozawa K, Kojima R, Kawabata-Shoda E, Yokoyama T, Ito H (QGP-1 cells release 5-HT via TRPA1 activation; a model of human enterochromaffin cells. *Mol Cell Biochem* 331:239-245.2009).
- Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO (HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 4:48.2008).
- Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Devesa I, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A (New Strategies to Develop Novel Pain Therapies: Addressing Thermoreceptors from Different Points of View. *Pharmaceuticals* 5:16-48.2011).
- Fujimura M, Kamio Y, Saito M, Hashimoto T, Matsuda T (Bronchodilator and bronchoprotective effects of cilostazol in humans in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 151:222-225.1995).
- Gaudet R (A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst* 4:372-379.2008).
- Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, Cordero-Morales JF, Hollopeter G, Chesler AT, Sanchez EE, Perez JC, Weissman JS, Julius D (Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* 464:1006-1011.2010).

- Grandl J, Hu H, Bandell M, Bursulaya B, Schmidt M, Petrus M, Patapoutian A (Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nature Neuroscience* 11:1007-1013.2008).
- Grandl J, Kim SE, Uzzell V, Bursulaya B, Petrus M, Bandell M, Patapoutian A (Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nat Neurosci* 13:708-714.2010).
- Guo Y, Yuan C, Tian F, Huang K, Weghorst CM, Tsai MD, Li J (Contributions of conserved TPLH tetrapeptides to the conformational stability of ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol* 399:168-181.2010).
- Hill K, Schaefer M (TRPA1 is differentially modulated by the amphipathic molecules trinitrophenol and chlorpromazine. *J Biol Chem* 282:7145-7153.2007).
- Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D (TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19564-19568.2006).
- Hoenderop JG, Bindels RJ (Epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 16:15-26.2005).
- Hollenberg MD (PARs in the stars: proteinase-activated receptors and astrocyte function. Focus on "Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways". *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1347-1350.2002).
- <http://www.origene.com/cdna/vectordiagram.aspx>; přístup 15. 4. 2015 10:00
- Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A (Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol* 5:183-190.2009).
- Chen J, Joshi SK, DiDomenico S, Perner RJ, Mikusa JP, Gauvin DM, Segreti JA, Han P, Zhang XF, Niforatos W, Bianchi BR, Baker SJ, Zhong C, Simler GH, McDonald HA, Schmidt RG, McGaraughty SP, Chu KL, Faltynek CR, Kort ME, Reilly RM, Kym PR (Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain* 152:1165-1172.2011).
- Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, Sun C, Walter K, Yao B, Kim D (Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat Commun* 4:2501.2013).
- Chen J, Kim D, Bianchi BR, Cavanaugh EJ, Faltynek CR, Kym PR, Reilly RM (Pore dilation occurs in TRPA1 but not in TRPM8 channels. *Mol Pain* 5:3.2009).
- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B (An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* 274:7325-7333.1999).
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260-265.2004).
- Kang K, Pulver SR, Panzano VC, Chang EC, Griffith LC, Theobald DL, Garrity PA (Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. *Nature* 464:597-600.2010).
- Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B (Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 27:9874-9884.2007).
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T (TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1273-1278.2009).

- Knowlton WM, Bifulck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD (TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150:340-350.2010).
- Kohno K, Sokabe T, Tominaga M, Kadowaki T (Honey bee thermal/chemical sensor, AmHsTRPA, reveals neofunctionalization and loss of transient receptor potential channel genes. *Journal of Neuroscience* 30:12219-12229.2010).
- Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N, Pineda-Trujillo NG, Ramirez JD, Zea J, Burley MW, Bedoya G, Bennett DL, Wood JN, Ruiz-Linares A (A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66:671-680.2010).
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP (TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50:277-289.2006).
- Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL (TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* 29:4808-4819.2009).
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G (ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 42:427-438.2007).
- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y (Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504:107-112.2013).
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A (Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445:541-545.2007).
- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A (The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* 15:929-934.2005).
- Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP (General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8784-8789.2008).
- May D, Baastrup J, Nientit MR, Binder A, Schunke M, Baron R, Cascorbi I (Differential expression and functionality of TRPA1 protein genetic variants in conditions of thermal stimulation. *J Biol Chem* 287:27087-27094.2012).
- McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, Didomenico S, Kort ME, Kym PR (TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain* 6:14.2010).
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM (TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13525-13530.2007).
- Mizumura K, Sugiura T, Katanosaka K, Banik RK, Kozaki Y (Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? *Exp Brain Res* 196:53-65.2009).
- Moran MM, McAlexander MA, Biro T, Szallasi A (Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 10:601-620.2011).
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J (Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25:4052-4061.2005).
- Nagatomo K, Ishii H, Yamamoto T, Nakajo K, Kubo Y (The Met268Pro mutation of mouse TRPA1 changes the effect of caffeine from activation to suppression. *Biophys J* 99:3609-3618.2010).

- Nagatomo K, Kubo Y (Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17373-17378.2008).
- Nassini R, Materazzi S, Andre E, Sartiani L, Aldini G, Trevisani M, Carnini C, Massi D, Pedretti P, Carini M, Cerbai E, Preti D, Villetti G, Civelli M, Trevisan G, Azzari C, Stokesberry S, Sadofsky L, McGarvey L, Patacchini R, Geppetti P (Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. *FASEB J* 24:4904-4916.2010).
- Nilius B (TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:805-812.2007).
- Nilius B, Prenen J, Owsianik G (Irritating channels: the case of TRPA1. *Journal of Physiology* 589:1543-1549.2011).
- Olsson MC, Kruger M, Meyer LH, Ahnlund L, Gransberg L, Linke WA, Larsson L (Fibre type-specific increase in passive muscle tension in spinal cord-injured subjects with spasticity. *J Physiol* 577:339-352.2006).
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:685-717.2006).
- Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Agarwal N, Kuner R, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB (Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:660-665.2007).
- Patil MJ, Jeske NA, Akopian AN (Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca<sup>2+</sup>. *Neuroscience* 171:1109-1119.2010).
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D (Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520:511-517.2015).
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38:233-252.2005).
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619-647.2006).
- Rosenzweig M, Brennan KM, Tayler TD, Phelps PO, Patapoutian A, Garrity PA (The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes and Development* 19:419-424.2005).
- Samad A, Sura L, Benedikt J, Ettrich R, Minofar B, Teisinger J, Vlachova V (The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochemical Journal* 433:197-204.2011).
- Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, Kobayashi S (Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res* 1160:39-46.2007).
- Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M (Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab* 8:237-248.2008).
- Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC (A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* 16:6486-6493.1996).
- Sotomayor M, Corey DP, Schulten K (In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure* 13:669-682.2005).

- Steen KH, Reeh PW (Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett* 154:113-116.1993).
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-829.2003).
- Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V (C-terminal Acidic Cluster Is Involved in Ca<sup>2+</sup>-induced Regulation of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel. *Journal of Biological Chemistry* 287:18067-18077.2012).
- Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JA, Damann N, Everaerts W, Benoit M, Janssens A, Vennekens R, Viana F, Nemery B, Nilius B, Voets T (Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci* 12:1293-1299.2009).
- Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglashan DW, Jr., Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA (Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol* 73:274-281.2008).
- Wan X, Lu Y, Chen X, Xiong J, Zhou Y, Li P, Xia B, Li M, Zhu MX, Gao Z (Bimodal voltage dependence of TRPA1: mutations of a key pore helix residue reveal strong intrinsic voltage-dependent inactivation. *Pflugers Arch.*2013).
- Wang L, Cvetkov TL, Chance MR, Moiseenkova-Bell VY (Identification of in vivo disulfide conformation of TRPA1 ion channel. *J Biol Chem* 287:6169-6176.2012).
- Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K (Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131:1241-1251.2008a).
- Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER (The Nociceptor Ion Channel TRPA1 Is Potentiated and Inactivated by Permeating Calcium Ions. *J Biol Chem* 283:32691-32703.2008b).
- Xiao B, Dubin AE, Bursulaya B, Viswanath V, Jegla TJ, Patapoutian A (Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J Neurosci* 28:9640-9651.2008a).
- Xiao Q, Prussia A, Yu K, Cui YY, Hartzell HC (Regulation of bestrophin Cl channels by calcium: role of the C terminus. *Journal of General Physiology* 132:681-692.2008b).
- Xu H, Blair NT, Clapham DE (Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* 25:8924-8937.2005).
- Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R (Structure of the human BK channel Ca<sup>2+</sup>-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science* 329:182-186.2010).
- Zhang XF, Chen J, Faltynek CR, Moreland RB, Neelands TR (Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel. *Eur J Neurosci* 27:605-611.2008).
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA (Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>. *Nat Neurosci* 10:277-279.2007).