

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Úloha reaktivních cysteinů v aktivaci lidského TRPA1 iontového kanálu

Role of reactive cysteines in the activation of the human TRPA1 ion channel

Diplomová práce

Bc. Viktor Synytsya

Vedoucí práce: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Praze dne

.....

Viktor Synytsya

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucí této diplomové práce, paní doktorce Viktorii Vlachové, za cenný náhled do studované problematiky a neutuchající vstřícnost a ochotu pomoci za všech okolností. Velký dík patří kolegyni Aničce Hynkové za trpělivost, ochotu, věcné rady a pomoc se zvládnutím potřebných laboratorních technik a chodu laboratoře. Děkuji také kolegyni Lucii Zímové za cennou pomoc nejen s přípravou mutantních konstruktů a všem kolegům z oddělení buněčné neurofyziologie za vytváření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

TRPA1 je teplotně citlivý iontový kanál patřící do rodiny TRP (transient receptor potential) receptorů. V primárních sensorických neuronech představuje TRPA1 klíčovou molekulu v transdukční dráze bolestivých podnětů, kde se podílí na detekci pálivých, dráždivých a zánětlivých látek endogenního i exogenního původu. Hlavním mechanismem chemické aktivace TRPA1 je kovalentní modifikace cysteinových a lysinových reziduí elektrofilními látkami. Účinnost agonistů je navíc zvýšena napětovou citlivostí TRPA1, jež se významně uplatňuje při depolarizaci buněčné membrány. Dosud byla prokázána účast několika N-terminálních cysteinů na aktivaci TRPA1, úloha šesti cysteinů v transmembránové oblasti však dosud nebyla systematicky prozkoumána.

Předložená diplomová práce se zaměřuje na funkční úlohu transmembránově lokalizovaných cysteinů v aktivaci lidského TRPA1 receptoru. Z výsledků vyplývá, že cysteinová rezidua nereagují přímo s elektrofilními látkami, čtyři z nich se však specificky uplatňují při napětové aktivaci a vrátkování iontového kanálu, dvě cysteinová rezidua ovlivňují modulaci TRPA1 vápenatými ionty.

Druhá část práce je zaměřená na zjištění topologické blízkosti dvou opačně nabitých reziduí, již dříve vytypovaných pro interakci prostřednictvím solných můstků. Současná substituce těchto reziduí za cystein (E854C/K868C) umožnila prokázat interakce mezi sousedními podjednotkami, stabilizující konformaci spojenou s chemickým a napětovým vrátkováním TRPA1 iontového kanálu.

Abstract

TRPA1 is a thermosensitive ion channel from the family of TRP (transient receptor potential) receptors. In primary sensory neurons, TRPA1 is an important transducer of painful stimuli, where it contributes to detection of noxious, irritant and inflammatory compounds of endogenous and exogenous origin. The major activation mode of TRPA1 is covalent modification of N-terminal cysteines or lysines by electrophilic compounds. The potency of the electrophilic agonists is increased by voltage dependency of the TRPA1 channel, which contributes substantially during membrane depolarization. To date, the role of several cysteine residues in the N-terminus has been demonstrated. However, the functional role of six cysteines in the transmembrane domain is still unknown.

The first part of the thesis focuses on the functional role of the transmembrane cysteines in the activation of human TRPA1 channel. Our results indicate that these sites do not mediate reactive-electrophile-induced activation but four of the six cysteines substantially contribute to voltage-dependent gating of the channel and two participate in calcium-dependent modulation of TRPA1.

In the second part of this thesis we aim to explore the proximity of two specific charged residues, located in the linker between the fourth and the fifth transmembrane domain. By using the double cysteine mutant E854C/K868C, we demonstrate that inter-subunit interactions between adjacent regions stabilize the conformations associated with chemically and voltage-induced gating of the TRPA1 ion channel.

1. Obsah

1. Obsah	6
2. Seznam zkratk	8
3. Úvod	10
4. Literární přehled	11
4.1 Fyziologická úloha TRPA1	11
4.2 Struktura TRPA1 receptoru	14
4.2.1 N- koncová část TRPA1	16
4.2.2 Transmembránová oblast TRPA1	19
4.2.3 C- koncová část TRPA1	20
4.3 Aktivace a modulace TRPA1 receptoru	21
4.3.1 Aktivace depolarizujícím napětím	21
4.3.2 Aktivace elektrofilními činidly	22
4.3.3 Aktivace neelektrofilními ligandy	24
4.3.4 Aktivace teplem a chladem	25
4.3.5 Modulace TRPA1 receptoru Ca^{2+} a Zn^{2+} ionty	26
4.4 Specifická úloha cysteinů ve funkci a struktuře membránových proteinů	27
5. Cíle práce	29
6. Materiál a metody	30
6.1 Chemikálie	30
6.2 Biologický materiál	30
6.3 Přístroje a pomůcky	31
6.4 Roztoky	31
6.5 Příprava DNA konstruktů	32
6.6 Horizontální elektroforéza	35
6.7 Transformace XL10-Gold ultrakompetentních buněk kmene <i>E. coli</i> metodou teplotního šoku	35
6.8 Izolace plasmidové DNA a následné ověření sekvenací	36
6.9 Tkáňové kultury a transfekce	36
6.10 Elektrofyzilogická technika <i>patch-clamp</i>	37
6.11 Napěťová a chemická aktivace	38
6.12 Hodnocení záznamů a statistická analýza	39
7. Výsledky	41
7.1 Charakterizace vlastností divokého typu TRPA1 receptoru	41
7.1.1 Stimulace TRPA1 receptoru depolarizačním napětím	41
7.1.2 Chemická stimulace TRPA1 receptoru	42
7.1.3 Závislost chemické odpovědi na osmolalitě aplikovaných roztoků	43

7.2	Charakterizace mutantních konstruktů transmembránových cysteinů	45
7.2.1	Depolarizující napětí	45
7.2.2	Chemická stimulace – skořicový aldehyd	48
7.2.3	Chemická stimulace – allylisothiokyanát	53
7.3	Popis oblasti S4-S5 linkeru v transmembránové doméně – mutace E854C/K868C	58
8.	Diskuse	60
9.	Závěr.....	68
10.	Použitá literatura	69

2. Seznam zkratek

AITC	allylisothiokyanát
AK	aminokyselina
AR	ankyrinová repetice
CA	skořicový aldehyd (z anglického „cinnamaldehyde“)
cDNA	DNA, vzniklá zpětným přepisem z RNA (z anglického „complementary DNA“)
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DRG	ganglia zadních kořenů míšních
dTRPA1	ortholog TRPA1 receptoru octomilky
TG	trigeminální ganglia
ECS	extracelulární roztok
ECS-0Ca ²⁺	extracelulární roztok s 0mM koncentrací Ca ²⁺ kationtů
ECS-2Ca ²⁺	extracelulární roztok s 2mM koncentrací Ca ²⁺ kationtů
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z anglického „ethylenediaminetetraacetic acid“)
EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová (z anglického „ethyleneglycoltetraacetic acid“)
FBS	fetální bovinní sérum (z anglického „fetal bovine serum“)
H-T-H	strukturní motiv helix-otočka-helix
HEK 293T	lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (z anglického „human embryonic kidney cells“)
HEPES	kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová (z anglického „(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid“)
hTRPA1	lidský ortholog TRPA1 receptoru
ICS	intracelulární roztok
Ins6P	inositolhexakisfosfát
LB medium	kultivační médium pro bakterie (z anglického „lysogeny broth“)
MgATP	adenosintrifosfát hořečnatý
mTRPA1	myší ortholog TRPA1 receptoru

PBS	fosfátový pufr (z anglického „phosphate buffered saline“)
pre-S1	pojící doména TRPA1 receptoru, předcházející S1 transmembránovému segmentu
P1 – P2	pórové helixy 1 a 2 TRPA1 receptoru
RPM	otáčky za minutu (z anglického „revolutions per minute“)
rsTRPA1	chřestýší ortholog TRPA1 receptoru
SCAM	metoda určení přístupnosti vybraného rezidua substitucí za cystein (z anglického „substituted-cysteine accessibility method“)
S1 – S6	označení transmembránových segmentů 1 až 6 TRPA1 receptoru
TRP	přechodný receptorový potenciál (z anglického „transient receptor potential“)
TRP-like	doména TRPA1 receptoru analogická k „TRP-boxu“ u příbuzného TRPV1 receptoru
TRPA1	ankyrinový TRP receptor typu 1
TRPM8	melastatinový TRP receptor typu 8
TRPV1	vaniloidní TRP receptor typu 1
$T_{50(off)}$	časová konstanta inaktivace
$T_{50(on)}$	časová konstanta aktivace
$V_{1/2}$	poloviční účinné napětí
WT	divoký typ lidského TRPA1 receptoru (z anglického „wild type“)

3. Úvod

Správná detekce vnějších podnětů a přiměřená fyziologická odpověď patří k základním předpokladům pro rozpoznání potenciálního nebezpečí a zachování integrity živého organismu. Z tohoto hlediska představuje rodina TRP (z anglického „Transient Receptor Potential“) iontových kanálů významnou skupinu transdukčních biomolekul, podílejících se na řadě fyziologických funkcí, včetně nocicepce – vzniku a přenosu signálu, jenž informuje organismus o přítomnosti dráždivých podnětů nebo poškození tkáně.

Rodina savčích TRP receptorů je kódována 28 geny a podle sekvenční homologie se dělí do šesti hlavních podrodin: TRPC (kanonické), TRPV (vaniloidní), TRPM (melastatinové), ankyrinové (TRPA), polycystinové (TRPP) a mukolipinové (TRPML) [1]. Iontové kanály všech zástupců TRP podrodin mají společnou strukturní charakteristiku – homotetramerně uspořádané receptorové podjednotky o šesti transmembránových segmentech a cytoplasmatickém N- a C- konci [2]. Pór kanálu je tvořen 5. a 6. segmenty a hydrofobními kličkami, obsahujícími jeden nebo dva pórové helixy. Vnější část póru vytváří selektivní filtr, určující propustnost a selektivitu kanálu [3].

Zástupce ankyrinové podrodiny TRP receptorů (dále TRPA) lze v různých sestříhových formách nalézt u mnoha druhů napříč živočišnou říší, od sasanek až po savce [1, 4]. Struktura TRPA1 se oproti ostatním TRP receptorům vyznačuje vyšším počtem (14 – 17) ankyrinových strukturních motivů na N- konci (například TRPV1 má na N- konci 4 – 6 ankyrinových repetit). U savců je TRPA1 receptor jediným zástupcem ankyrinové rodiny. Poprvé byl gen kódující TRPA1 receptor rozpoznán roku 1999 v lidských fibroblastech [5]. Později se podařilo prokázat expresi TRPA1 receptoru na nervových zakončeních aferentních senzoričkových neuronů, jejichž těla se nacházejí v gangliích zadních kořenů míšních (dále DRG) a trigeminálních gangliích (dále TG), kde zprostředkováná převod dráždivých podnětů na vznik akčního potenciálu [6]. TRPA1 je exprimován i v non-neurálních buňkách, například v keratinocytech, kde ovlivňuje proliferaci a diferenciaci [7].

Funkci TRPA1 receptoru jako iontového kanálu odhalila roku 2003 studie [8], ve které vykazoval myší ortholog citlivost vůči chladu a chemickým podnětům. Postupem času se TRPA1 ukázal být polymodálním senzorem - byla objevena řada

dalších podnětů stimulujících aktivaci TRPA1 kanálu (teplo [9], mechanické podněty [10], osmotický tlak [11], změna pH [12], zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých nebo zinečnatých iontů [3, 13]). Škála účinků aktivátorů TRPA1 receptoru se liší u jednotlivých živočišných druhů. Například kofein aktivuje myši TRPA1 (dále mTRPA1), ale inhibuje lidský (dále hTRPA1) [14], myši TRPA1 je aktivován chladem, zatímco žabí TRPA1 je aktivován teplotami nad 39 °C [9]. Většina TRPA1 orthologů má společnou citlivost vůči dráždivým substancím elektrofilní povahy, což svědčí o evolučně původním funkčním významu tohoto receptoru [15]. Elektrofilní činidla, jako například skořicový aldehyd (dále CA) nebo allylisothiokyanát (AITC), aktivují TRPA1 receptor tvorbou kovalentní vazby s cysteinovými či lysinovými rezidui na N-konci proteinu [16, 17]. Receptor si však zachová citlivost vůči elektrofilům i v případě odstranění značné části N- konce [18], což naznačuje, že se na aktivaci TRPA1 podílejí i další cysteiny v transmembránové oblasti a na cytoplasmatickém C- konci.

Předložená diplomová práce se zaměřuje na úlohu cysteinových reziduí v transmembránové oblasti v aktivaci lidského TRPA1 iontového kanálu elektrofilními činidly a modulaci jejich účinku vápenatými ionty. Věnuje se také možnosti ověření blízkosti dvou částí transmembránových podjednotek využitím dvojcysteinové mutace.

4. Literární přehled

4.1 Fyziologická úloha TRPA1

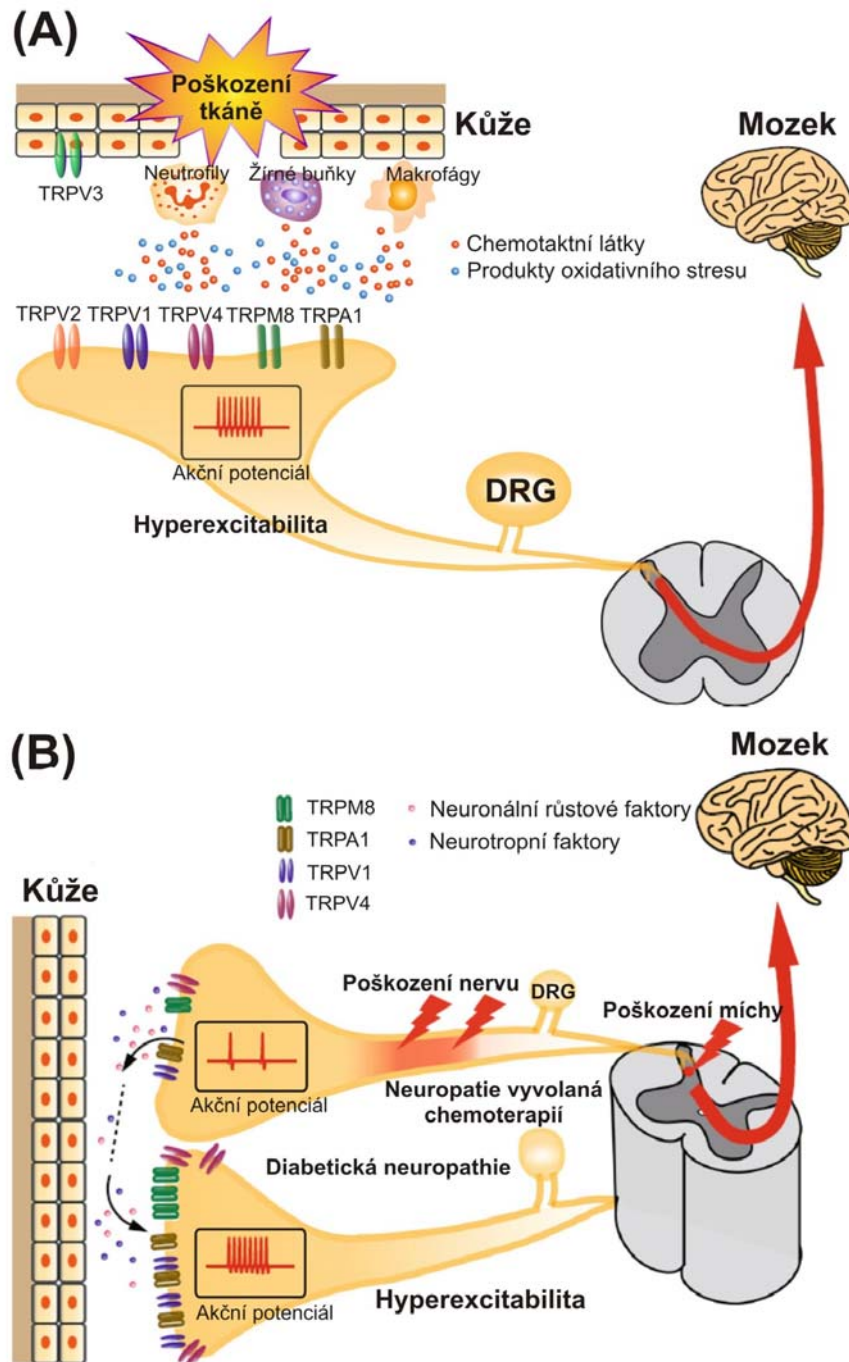
U savců byla přítomnost TRPA1 receptoru potvrzena v různých tkáních a orgánových soustavách, včetně nervového systému, gastrointestinálního traktu, kardiovaskulárního systému, močového měchýře a mnoha dalších. Funkce TRPA1 se v jednotlivých orgánech liší, zpravidla však jde o propojení aktivity neuronů s fyziologickými a patologickými procesy, probíhajícími v inervovaných buňkách [19]. Mezi hlavní úlohy TRPA1 receptoru patří převod rozličných dráždivých sensorických stimulů na elektrický signál, který je převáděn do centrální nervové soustavy (dále CNS), kde může být daný podnět vyhodnocen jako bolestivý.

Mezinárodní společnost pro studium bolesti (IASP) definuje bolest jako „nepříjemný smyslový a pocitový zážitek multidimenzionálního charakteru, spojený se skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně, anebo je v termínech takového poškození popisován“ [20]. Nervový proces, zahrnující detekci, vedení a centrální

zpracování signálu o (potenciálním) poškození je nazýván nocicepcí. Bolestivý signál vyvolaný poškozením tkáně je nejprve detekován volnými nervovými zakončeními periferních nervových vláken, zvaných nociceptory [21]. Z těl nociceptorů lokalizovaných v DRG a TG vychází periferní a centrální axonová vlákna, která inervují cílový orgán a míchu. Pomocí nociceptorů je převeden bolestivý signál do CNS, kde je nepříjemný smyslový a pocitový zážitek zpracován [22]. Podoba bolestivého signálu je utvářena kombinací akčních potenciálů dvou hlavních typů nociceptorů. Jako první se projeví krátká ostrá bolest, vyvolaná rychle vedoucími myelinizovanými A δ - vlákny. Poté následuje opožděná, déletrvající složka bolesti vedená nemyelinizovanými C- vlákny [21]. Samotná detekce bolestivých signálů na nervových vláknech je společně s převodem na akční potenciál zprostředkována specificky exprimovanými iontovými kanály, včetně několika zástupců TRP rodiny (TRPV1-4, TRPA1, TRPM8) [23].

Bolest lze podle typu patogeneze rozdělit na zánětlivou a neuropatickou. Akutní zánět je přirozenou biologickou odpovědí na poškození tkáně, které prostřednictvím zánětotvorných činidel aktivuje celou řadu buněk v blízkém okolí (keratinocyty, žírné buňky, buňky imunitního systému) (obr. č. 1.A na str. 13). Ty skrze uvolnění mediátorů zánětu (ATP, bradykinin, prostaglandin, histamin) a produktů oxidativního stresu stimulují primární aferentní neurony, inervující poškozenou tkáň [23, 24]. TRP receptory se ukázaly být významnou skupinou proteinů zprostředkovávajících zánětlivou bolest. Aktivace a/nebo senzitivizace TRPA1 receptoru mediátory zánětu vede k depolarizaci membrány a vzniku akčního potenciálu. Depolarizace zároveň spouští uvolnění neuropeptidů (substance P, neurokinin A) podporujících vasodilataci, akumulaci neutrofilů a hypersenzitivitu okolní tkáně. Zvýšená citlivost nociceptorů v zanícené tkáni tak zapříčiní obranné chování jedince a podpoří procesy hojení [25].

Neuropatická bolest je způsobena lézí neuronů v somatosenzorickém nervovém systému, například během cukrovky [25] nebo v důsledku chemoterapie [26] (obr. č. 1.B na str. 13). Původem neuropatické bolesti je patofyziologická změna v primárních sensorických neuronech a s tím spojená změna v integraci a zpracování signálů v CNS. Expres TRP receptorů v poškozeném neuronu je snížena, zřejmě v důsledku ztráty neurotrofních faktorů [27, 28]. V sousedních nepoškozených neuronech však byla zaznamenána zvýšená exprese TRPA1 a TRPV1 receptorů [27, 29]. Poškozené neurony pravděpodobně uvolňují růstové faktory a neurotransmitery do blízkého okolí, čímž zvýší excitabilitu okolních neuronů.

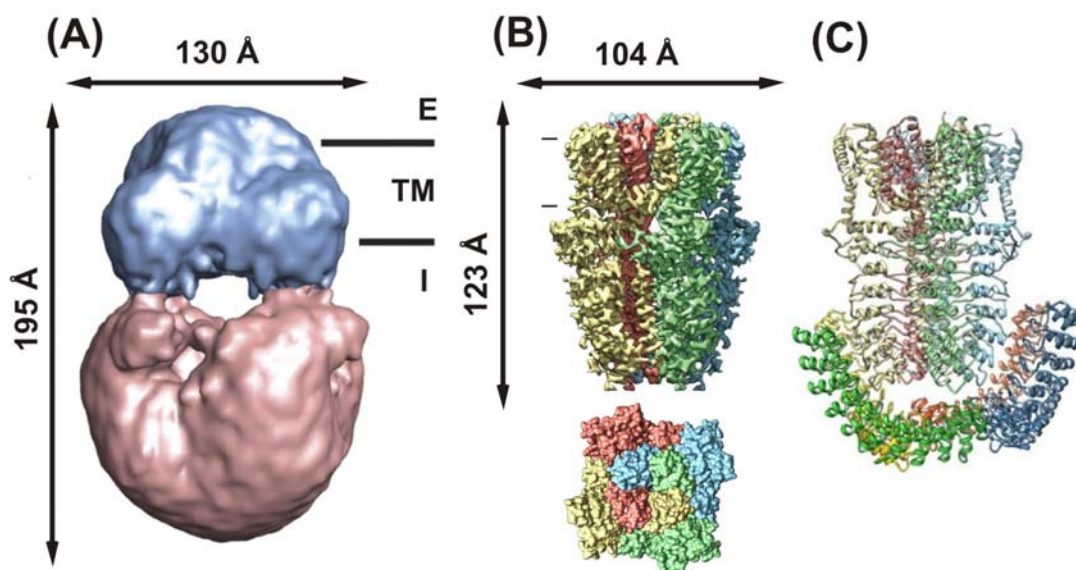


Obrázek č. 1: Úloha TRP kanálů v bolesti. **(A)** V reakci na poškození tkáně uvolňují epiteliální, žírné a imunitní buňky do svého okolí směs chemotaktických látek (mediátory zánětu) a produktů oxidativního stresu. Ty dále aktivují a TRP receptory na senzoričkových neuronech (DRG), ať už přímo, nebo prostřednictvím vnitřních signalizačních drah, což vede ke vzniku akčních potenciálů přenášejících informaci do mozku. Mediátory zánětu navíc zvyšují citlivost kanálů vůči aktivačním podnětům a přispívají tak k hyperexcitabilitě neuronu. **(B)** V důsledku poškození nebo po chemoterapii dochází v poškozeném neuronu ke ztrátě neurotrofních faktorů, což vede ke snížené expresi TRP receptorů a menší excitabilitě. V okolních neuronech je naopak exprese TRP kanálů v důsledku uvolnění neurotrofních a růstových faktorů zvýšena, čímž dochází ke zvýšené vzruchovosti. (převzato a upraveno podle [22]).

4.2 Struktura TRPA1 receptoru

Primární strukturu podjednotky lidského TRPA1 receptoru tvoří celkem 1119 aminokyselin (AK) (pro srovnání: myši TRPA1 1115 AK, octomilčí 1197 AK). Protein lze topologicky rozdělit na transmembránovou část a cytoplasmaticky orientované N- a C- konce, ve kterých je soustředěna značná část primární sekvence proteinu (asi 78%) [30]. Iontový kanál TRPA1 je homotetramerem symetricky uspořádaných podjednotek, byly však pozorovány také případy formace iontového kanálu kombinací TRPA1 podjednotek s příbuzným TRPV1 receptorem [31].

Lokalizace části TRPA1 proteinu v membráně společně se značnou flexibilitou dlouhého N- konce znesnadňují získání strukturálních dat s dostatečným rozlišením. První informaci o molekulárním uspořádání TRPA1 přinesl rok 2011, kdy autoři stabilizovali iontový kanál solubilizací detergentem a pomocí elektronové mikroskopie s rozlišením 16 Å popsali strukturu myšního orthologu [30]. Z rekonstrukce 3-D hustotní mapy je patrné tetramerické uspořádání podjednotek (obr. č. 2.A). Strukturu lze rozdělit na dvě odlišné oblasti – transmembránovou část obalenou použitým detergentem



Obrázek č. 2: Struktura TRPA1 iontového kanálu. (A) Kryoelektronová struktura TRPA1 iontového kanálu o rozlišení 16 Å. Modře je vyznačena transmembránová oblast, růžově cytoplasmatická část proteinu (převzato a upraveno podle [30]). E = extracelulární prostor, TM = transmembránová oblast, I = intracelulární prostor. (B) Hustotní 3-D mapa hTRPA1 iontového kanálu, získaná pomocí kryoelektronové mikroskopie v rozlišení 3,5 Å, pohled z boku (nahore) a shora (dole). Jednotlivé podjednotky jsou odlišně zbarveny (převzato a upraveno podle [33]). (C) Jedno z předpokládaných uspořádání nerozlišených N-konců v hTRPA1 kryoelektronové struktuře (převzato z [33]).

a cytoplasmatickou oblast ve tvaru kompaktního „zavěšeného košíku“ [30]. Výrazná je také vnitřní dutina kanálu v cytoplasmatické části.

Další nové poznatky o struktuře TRPA1 proteinu přinesla nedávná studie z roku 2015, ve které se autorům podařilo pomocí kryoelektronové mikroskopie zmapovat iontový kanál s rozlišením kolem 4 Å (obr. č. 2.B na str. 14). Kromě vzdálených cytoplasmatických oblastí, několika flexibilních kliček mezi transmembránovými segmenty a krátkého helixu na C-konci tak obsáhli strukturu přibližně 50 % proteinu, jež začíná K446 a končí T1078. Zajímavé je kompaktní uspořádání cytoplasmatické části kanálu – proximální ankyrinové repeticity na N-konci se nachází v těsné blízkosti C-konců, vedoucích směrem od pórové oblasti kanálu. Naopak vzdálená část N-konce se ukázala jako velice flexibilní. Autoři usoudili, že pravděpodobně vytváří strukturu podobnou „půlměsíci“ (obr. č. 2.C na str. 14).

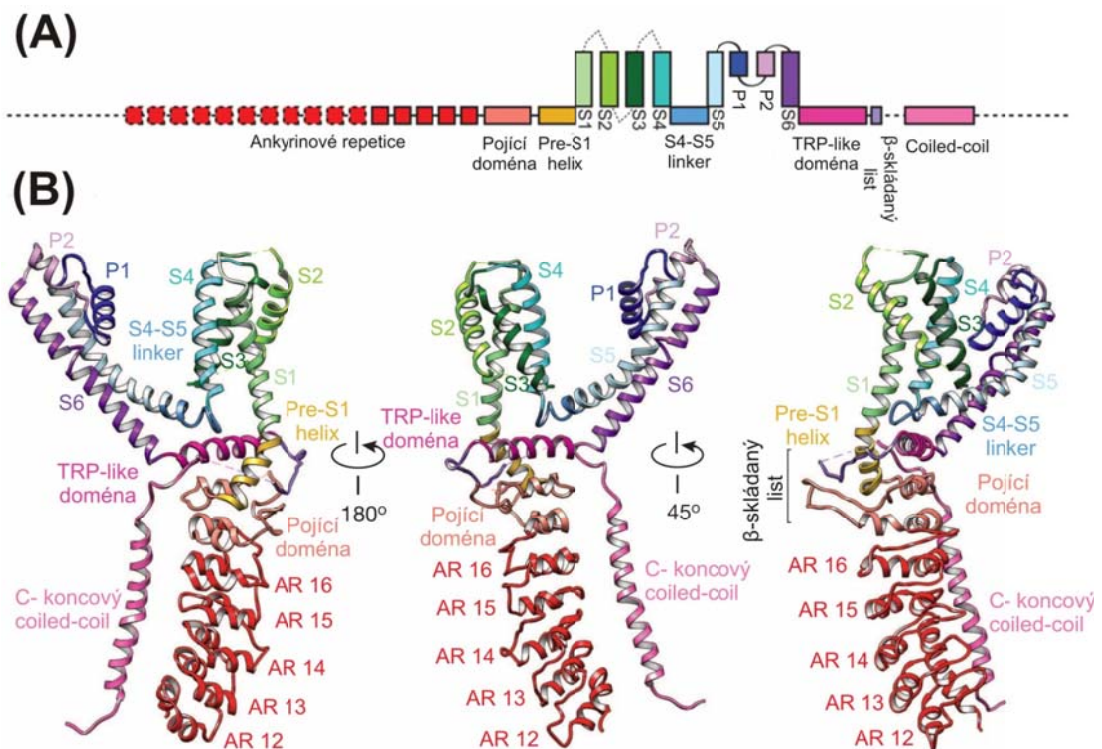
Výše uvedená strukturní data poskytují cenné informace o prostorovém uspořádání receptorových podjednotek a mohou tak přispět k interpretaci současných experimentálních dat a pochopení molekulárních mechanismů aktivace TRPA1. Obě publikované struktury se však ne zcela shodují, liší se zejména z hlediska pozic reaktivních cysteinů a předpokládaných disulfidických můstků a prostorovým uspořádáním N-konců [32].

Schematicky je znázorněna topologie TRPA1 receptoru na obr. č. 3.A na str. 16. Na N-konci je predikováno celkem 16 ankyrinových repetic (dále AR), z nichž posledních pět – AR12 až AR16 – je rozpoznáno v publikované struktuře [33]. V části N-konce blíže transmembránové oblasti se dále nachází „pojící doména“ (dále pre-S1), tvořená dvěma motivy helix-otočka-helix (dále H-T-H) a dvěma antiparalelními β -vláknami, a také α -šroubovice (pre-S1 helix), plynule přecházející do prvního transmembránového segmentu (obr. č. 3.B na str. 16). Transmembránová oblast je tvořena celkem šesti membránovými helixy (S1 – S6), přičemž segmenty S5 a S6, jež jsou propojeny kličkou obsahující dva krátké helixy (P1 a P2) a selektivní filtr, formují centrální část kanálu. Transmembránové segmenty jsou vzájemně propojeny intracelulárně a extracelulárně orientovanými kličkami, přičemž klička mezi S4 a S5 segmenty zaujímá šroubovicové uspořádání. Na S6 segment je napojena predikovaná α -šroubovice, směřující pod spodní pórovou oblast kanálu. Tato struktura je analogická tzv. „TRP-boxu“ (dále TRP-like) v TRPV1 receptoru, ačkoliv postrádá pro TRP-box

specifický sekvenční motiv. Dalším překvapivým objevem je formace tetramerní paralelní coiled-coil domény, směřující směrem od póru kanálu.

4.2.1 N- koncová část TRPA1

Aminový konec TRPA1 tvoří asi 64 % proteinu [30] a obsahuje 16 ankyrinových repetic. Ankyrinová repetice (AR) představuje poměrně běžný konzervovaný sekvenční motiv zpravidla 33 aminokyselin, jehož sekundární strukturu tvoří dvě antiparalelní α -šroubovice spojené β -otáčkou. Vyskytují se v tandemovém uspořádání podobném pružinám a hrají tak významnou roli v převodu mechanických podnětů na vrátkování kanálu [34]. Pro TRPA1 bylo predikováno 14 – 17 ankyrinových repetic, důvodem nestejného počtu je použití různých predikčních algoritmů a charakteristicky nízká sekvenční homologie koncových repetic. Například v práci [35]



Obrázek č. 3: (A) Schéma popisující strukturní motivy TRPA1 receptorové podjednotky. N- konec obsahuje celkem 16 ankyrinových repetic a „pojící doménu“. Transmembránová část obsahuje šest helikálních transmembránových segmentů (S1 – S6), tělo póru tvoří S5 a S6 segment s kličkou obsahující dva pórové helixy (P1 a P2). S4-S5 linker odděluje senzornou transmembránovou část od pórové oblasti. S6 segment přechází do TRP-like domény. Čárkovaně jsou označeny oblasti s nerozlišenou detailní strukturou. (B) Stužkový diagram znázorňující podjednotku TRPA1 receptoru ze tří různých úhlů. (převzato z [33]).

je predikováno 17 AR, poslední repetice však odpovídá motivu H-T-H v publikované struktuře [33]. Na základě analogie s jinými proteiny obsahujícími ankyrinové repetice se předpokládá významná role N- konce v protein-proteinových interakcích a správné inserci proteinu do plasmatické membrány. Skutečně bylo zjištěno, že odstraněním N- konce dojde k narušení transportu TRPA1 do plasmatické membrány. Poškozený protein se pak hromadí společně s adhezním proteinem cadherinem v endoplasmatickém retikulu a není transportován na povrch buňky [36]. Pokud však je protein bez N- konce převeden do umělé membrány, zachovává si citlivost na chemické i teplotní podněty [18].

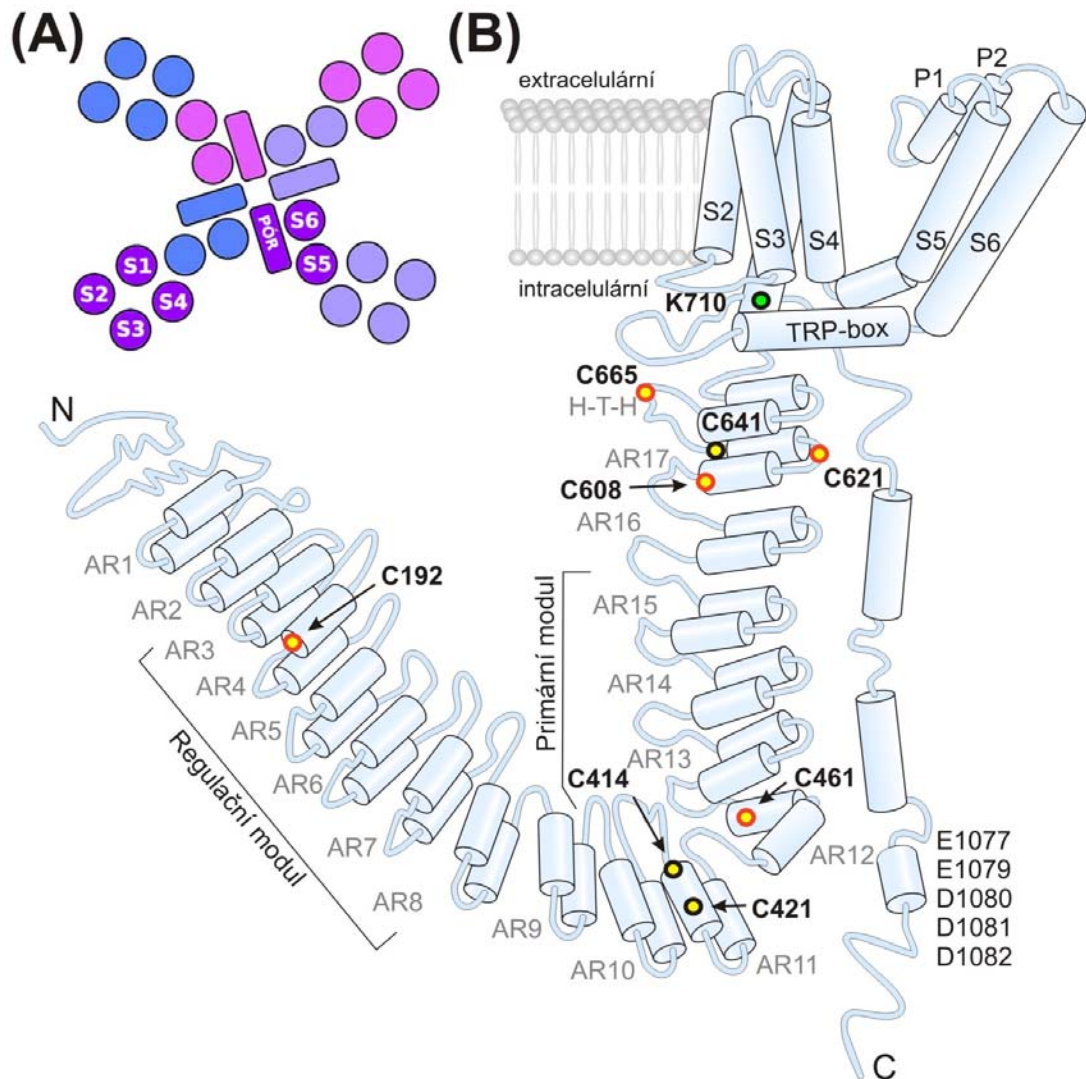
N- konec lze rozdělit na dvě části: relativně dobře definovaný konvexní „stonek“ a strukturně slabě rozlišenou flexibilní oblast připomínající půlměsíc (obr. č. 4.B na str. 18). Oblast „stonku“ je tvořena pěti AR, které jsou vzájemně propojeny řadou hydrofobních a několika polárními interakcemi. Flexibilní část distálního N- konce obsahující dalších 11 predikovaných AR pravděpodobně směřuje vzhůru k plasmatické membráně a zaujímá tvar půlměsíce [33].

N- konci TRPA1 je přisuzována schopnost rozpoznávat celou řadu podnětů a převádět je na vrátkování v centrální části kanálu. Bylo zde lokalizováno několik významných cysteinových a jedno lysinové reziduum (C414, C421, C621, C641, C665 a K710, číslováno podle sekvence hTRPA1 podjednotky), podílejících se na detekci elektrofilních agonistů prostřednictvím kovalentní modifikace TRPA1 proteinu [16, 17, 37] (významná rezidua jsou označena na obr. č. 4.B na str. 18). Cysteiny C414 a C421 se nacházejí v predikované AR11, zatímco C621, C641 a C665 náleží do dlouhé flexibilní kličky propojující N- konec s pre-S1 helixem a K710 patří do pre-S1 helixu. Neutralizací těchto reziduí metodou cílené mutagenese dojde ke snížení citlivosti TRPA1 vůči elektrofilům [16]. Zároveň některé cysteiny mohou mezi sebou tvořit disulfidické můstky a tím dále regulovat funkci receptoru. Reziduum C665 je schopno tvořit disulfidický můstek s hned několika rezidui: C621, C462 a C193. Cystein C621 navíc může reagovat s C608 [38].

Studie [39] prokázala na základě rozdílných funkčních vlastností lidského a chřestýšího TRPA1 orthologu (dále rsTRPA1) roli N- konce v detekci teplotních podnětů. Tuto funkci zprostředkovávají dva prostorově oddělené moduly, které jsou s různou citlivostí schopny samostatně rozpoznat tepelné či chemické podněty: primární modul (AR10 – AR15) a regulační modul (AR3 – AR8). Vložení primárního modulu

z rsTRPA1 do teplem neaktivovaného hTRPA1 byl vytvořen konstrukt aktivovaný zvýšením teploty [39].

V AR12 se nachází mezidruhově konzervovaný motiv, pro svůj charakteristický tvar známý jako „EF-hand“, jenž by mohl fungovat jako vazebné místo pro vápenaté ionty [40]. Tato hypotéza však nebyla potvrzena – mutace záporně nabitých reziduí



Obrázek č. 4: (A) Schematické uspořádání transmembránových segmentů. Pórové segmenty S5 a S6 se nacházejí v blízkosti sensorické části S1 – S4 sousední podjednotky (převzato a upraveno podle [2]). (B) Schéma topologie lidského orthologu TRPA1 podjednotky podle kryoelektronové struktury. Na N-konci se nachází celkem 16 ankyrinových repetic (AR). N-konec je rozdělen na dvě části: primární modul (AR10 – AR15) a regulační modul (AR3 – AR 8). Ve schématu jsou vyznačena významná cysteinová (žlutě) a lysinová (zeleně) rezidua, podílející se na vazbě elektrofilních agonistů. V červeném kroužku jsou označena rezidua potenciálně tvořící inter- nebo intramolekulární disulfidické můstky. V transmembránové oblasti se nachází šest transmembránových segmentů (S1 – S6) a dva pórové helixy (P1, P2). Na C-konci jsou uvedena záporně nabitá rezidua, která hrají roli v modulaci receptoru vápenatými kationty.

v dané sekvenci nevedla ke změnám v potenciaci nebo inaktivaci, závislé na intracelulární koncentraci Ca^{2+} [3]. Delece EF-hand motivu navíc vedla k poruše dopravení TRPA1 na plasmatickou membránu [36]. Studie chimérních konstruktů naznačuje lokalizaci Ca^{2+} senzitivního modulu v oblasti blízké AR11 [39].

4.2.2 Transmembránová oblast TRPA1

Transmembránová část TRPA1 iontového kanálu je tvořena 22 % celkové sekvence proteinu. Šest transmembránových segmentů je propojeno extracelulárně a intracelulárně orientovanými kličkami. Periferní část kanálu je tvořena S1 až S4 segmenty, zatímco S5 a S6 segmenty spojené kličkou obsahující dva pórové helixy (P1 a P2) formují pór kanálu. Helixy z jednotlivých podjednotek jsou do sebe vzájemně šroubovitě propleteny – pórové segmenty jedné podjednotky se nachází v blízkosti periferní oblasti sousedící podjednotky (viz obr. č. 4.A na str. 18).

TRPA1 iontový kanál propouští neselektivně mono- a divalentní kationty po směru elektrochemického gradientu. Selektivita a propustnost kanálu je významnou měrou určována selektivním filtrem mezi P1 a P2 pórovými helixy. Regulace toku iontů je řízena prostřednictvím dvou vrátek (anglicky „gate“). Horní vrátka jsou tvořena jedním reziduem D915, nacházejícím se mezi helixy selektivního filtru. Toto reziduum již bylo dříve popsáno v souvislosti s regulací relativní propustnosti dvojmocných kationtů [3]. Funkci spodních vrátek plní dvě hydrofobní formace reziduí I957 a V961 v S6 segmentu [33]. Velikost póru lze ovlivnit přidáním agonisty – stimulací TRPA1 receptoru hořčičným olejem bylo dosaženo roztažení průměru póru o 3 Å a zvýšení selektivity kanálů vůči Ca^{2+} kationtům [41].

Mechanismus otevírání a zavírání TRPA1 kanálu se dosud nepodařilo zcela objasnit. Nová strukturální data naznačují, že se TRP-like doména na proximální části C-konce a S4-S5 oblasti podílí na převodu strukturálních změn v N-konci do pórové oblasti. Oblast pojící domény, kde se nachází významná cysteinová rezidua, je s TRP-like doménou propojena prostřednictvím několika hydrofobních kontaktů mezi α -helixy. TRP-like doména zároveň vytváří další kontakty s pre-S1 helixem a S4-S5 spojem, který se nachází v blízkosti spodních vrátek. Vazba elektrofilní látky tak může spustit řadu konformačních změn, uvolňujících vzniklé sterické pnutí a/nebo elektrostatickou repulzi vlivem chemické modifikace cysteinového rezidua [33].

Další vhléd do obecného mechanismu vrátkování TRP kanálů poskytuje studie založená na srovnávací sekvenční analýze statistického souboru sekvencí TRP kanálů a příbuzných draselných Kv kanálů [2]. Podle autorů je hlavním společným mechanismem polymodálního vrátkování TRP kanálů oslabení účinku vodíkových vazeb v S6 segmentu, což v důsledku vede ke změně orientace hydrofobních reziduí ve spodních vrátkách kanálu.

Mutace N855S v oblasti S4-S5 souvisí s dědičným onemocněním – familiálním epizodickým bolestivým syndromem [42]. Pacienti mívají bolestivé záchvaty vyvolané únavou, hladověním nebo chladem. Elektrofyzilogickými studiemi byla prokázána zvýšená aktivita mutantního kanálu, kterou autoři interpretovali jako pravděpodobnou destabilizaci zavřeného stavu [43]. Substituce N855S zároveň oslabuje interakci mezi S4-S5 linkerem a S1 helixem [44]. Na S4-S5 linkeru jsou lokalizována nabitá rezidua E854 a K868, která tvorbou solného můstku mezi podjednotkami stabilizují otevřený stav kanálu [45]. Výše uvedené studie potvrzují významnou roli S4-S5 linkeru ve vrátkovacím mechanismu TRPA1 kanálu.

4.2.3 C- koncová část TRPA1

Karboxylový konec TRPA1 receptoru představuje asi 14% z celkové délky proteinu [30]. Na C- konci bylo predikováno celkem šest helikálních oblastí. Kryoelektronová mikroskopie odhalila α -šroubovici navazující na S6 segment, analogickou k TRP-boxu popsaného u TRPV1 receptoru, která směřuje pod spodní vrátkovou část kanálu [33]. Tato doména (TRP-like) pravděpodobně funkčně propojuje řadou intramolekulárních interakcí N- konec receptoru s centrální částí póru a účastní se chemicky a napěťově závislého vrátkování kanálu [33, 46]. Bodové mutace reziduí R975, K988 a K989 lokalizovaných v TRP-like motivu výrazně ovlivnily míru a rychlost aktivace depolarizujícím napětím [46].

Významným strukturním prvkem TRPA1 iontového kanálu je paralelní tetramerní coiled-coil motiv, nacházející se pod centrální částí póru. Je tvořen dlouhými α -šroubovicemi na C- koncích, které spolu na dvou místech interagují prostřednictvím postranních řetězců isoleucinu (I1044 a I1065). Oproti jiným kanonickým coiled-coil motivům, ve kterých se na kontaktních pozicích nachází zpravidla hydrofobní aminokyseliny, obsahuje TRPA1 navíc na obou interakčních místech glutamin, který může destabilizovat strukturu (Q1047) a/nebo přispívat ke stabilizaci tvorbou

intraplanárních vodíkových můstků (Q1061). V publikované struktuře byl během purifikačního procesu použit inositolhexakisfosfát (dále Ins6P), již dříve popsán pro svou schopnost stabilizovat kanál [47]. Bylo odhaleno, že se Ins6P váže na bazické aminokyseliny v prostorové blízkosti Q1047, což mohlo působit proti destabilizačnímu efektu Q1047 [33].

Na distálním C- konci se nachází vysoce konzervovaný úsek negativně nabitých aminokyselin ¹⁰⁷⁷ETEDDD¹⁰⁸² (obr. č. 4.B na str. 18), který hraje významnou roli v Ca²⁺ závislé modulaci receptoru [48]. Cílená mutageneze těchto kyselých aminokyselin ovlivnila kinetiku potenciace receptoru vápenatými ionty.

4.3 Aktivace a modulace TRPA1 receptoru

TRPA1 představuje polymodální receptor aktivovaný celou škálou podnětů, vzájemně modulujících aktivační účinek. Zřejmě v důsledku evoluce je pro většinu orthologů TRPA1 společná aktivace depolarizačním napětím a dráždivými elektrofilními substancemi, zpravidla rostlinného původu [15]. Postupem času se však u různých živočišných druhů rozrostla paleta aktivátorů o další aktivační stimuly. V případě některých hadích orthologů převažuje citlivost vůči teplotě nad chemickou aktivací [49]. Naopak savčí TRPA1 může být aktivován chladem nebo například mentholem, který pocit chladu navozuje [50].

4.3.1 Aktivace depolarizujícím napětím

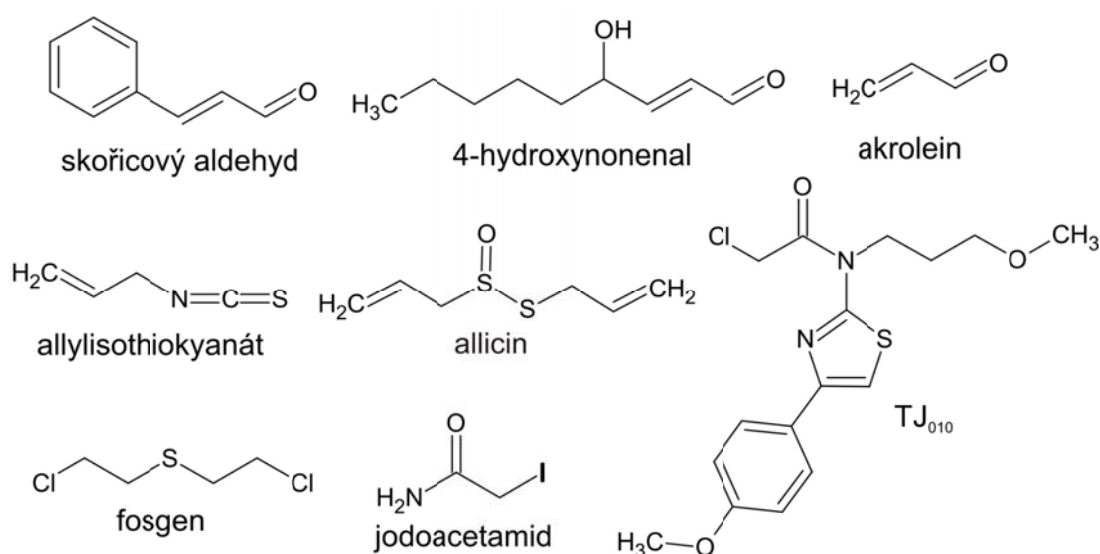
Změna membránového potenciálu patří pro většinu TRP kanálů spíše k slabším aktivačním stimulům. Kanály sice mohou být aktivovány samotnou depolarizací, polovina maximální vodivosti (parametr $V_{1/2}$) je však dosaženo až při vyšších hodnotách kladného a fyziologicky irelevantního membránového potenciálu nad +100 mV [51]. Příčinou slabé napěťové závislosti může být malý náboj spojený s vrátkováním kanálu (u TRP kanálů v rozmezí 0,4 – 0,9 elementárního náboje [52]). Teplotními změnami nebo přidáním agonisty však dochází k modulaci napěťově závislého otevírání kanálu, což posune závislost proudové odpovědi na napětí směrem k negativnímu potenciálu, v důsledku čehož je zvýšen podíl otevřených kanálů za fyziologických podmínek [52, 53].

4.3.2 Aktivace elektrofilními činidly

Existuje celá řada elektrofilních látek exogenního i endogenního původu, které aktivují TRPA1 receptor (obr. č. 5). Předpokládá se, že aktivace je podmíněna tvorbou kovalentní vazby s thiolovou skupinou cysteinu nebo aminovou skupinou bazických aminokyselin. Míra aktivačního účinku závisí na celé řadě faktorů: elektrofilitě a objemnosti agonisty, propustnosti agonisty skrz plasmatickou membránu, hodnotě pK_A reaktivní thiolové nebo aminové skupiny, stálosti vzniklého aduktu a hodnotě pH v okolí. Na cytoplasmatickém N- konci byla rozpoznána významná rezidua, sloužící jako hlavní reakční místo pro elektrofilny [16, 17, 54], některé studie naznačují existenci dalších aminokyselin zapojených do aktivace [18].

Je popsáno několik mechanismů účinku elektrofilů na cysteiny. V případě α,β - nenasycených aldehydů (skořicový aldehyd ve skořici [6], produkt oxidativního stresu 4-hydroxynonenal [55], výfukový plyn akrolein [56]) probíhá aktivace mechanismem zvaným Michaelova adice (obr. č. 6.A na str. 23). Nukleofil v podobě disociované $-SH$ skupiny atakuje C_β uhlík s kladným parciálním nábojem za vzniku enolátového iontu, protonace C_α pak vede ke vzniku nasyceného produktu. Další látky mohou působit na cysteiny jako alkylační činidla (např. jodoacetamid [17] nebo bojový plyn yperit [57]), nebo za tvorby disulfidických můstků (v česneku obsažený allicin [58]).

Jedním z nejznámějších aktivátorů TRPA1, v křenu obsažený allylisothiokyanát (AITC), se může reverzibilní adiční reakcí konjugovat s deprotonovanou skupinou

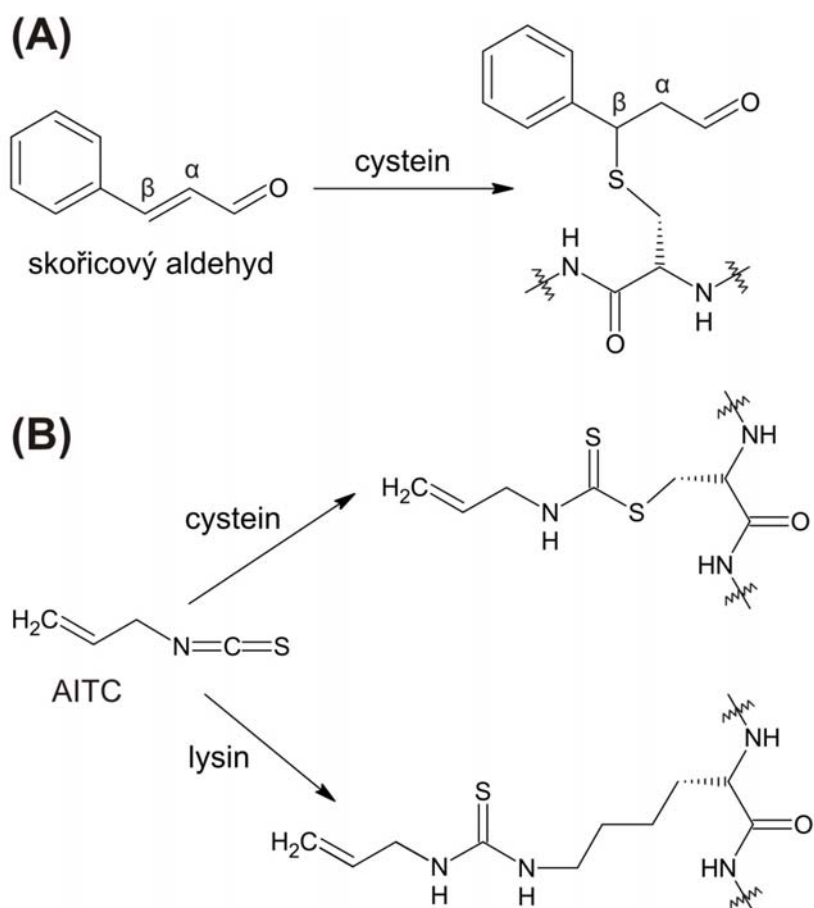


Obrázek č. 5: Struktura vybraných elektrofilních agonistů TRPA1 receptoru.

cysteinu za vzniku dithiokarbamátu (obr. č. 6.B nahoře). Analogická reakce s lysinem vede ke vzniku stabilního spojení ve formě thiomocoviny. (obr. č. 6.B dole) [59, 60].

Podobně funguje také selektivní agonista TJ₀₁₀, účinkující již při subnanomolární koncentraci. Bylo zjištěno, že se TJ₀₁₀ váže s vysokou specifitou na C621 do dutiny s komplementárním tvarem, kde je pravděpodobně stabilizován [54].

TRPA1 může být přímo aktivován také rozpuštěnými plyny jako O₂ [61], H₂S [62] a NO [63] příslušnými reakcemi s cysteinovými rezidui (oxidace, sulfhydratace, nitrosylace). Skupina [61] studovala pomocí metody *calcium imaging* aktivitu TRPA1 při různé koncentraci rozpuštěného kyslíku. Autoři předpokládají, že při normoxii je TRPA1 udržován v inaktivaci díky hydroxylaci rezidua P394 prolyl hydroxylasou. Při hypoxii se sníží aktivita prolyl hydroxylasy, což vede k postupné aktivaci TRPA1. Zvýšená koncentrace kyslíku zase vyvolá přímou oxidaci C633 a C856, která překoná inaktivační účinek hydroxylace prolinu.



Obrázek č. 6: (A) Reakce skořicového aldehydu s cysteinovým reziduem proteinu. (B) Reakce AITC s cysteinem (nahore) a lysinem (dole) v proteinu.

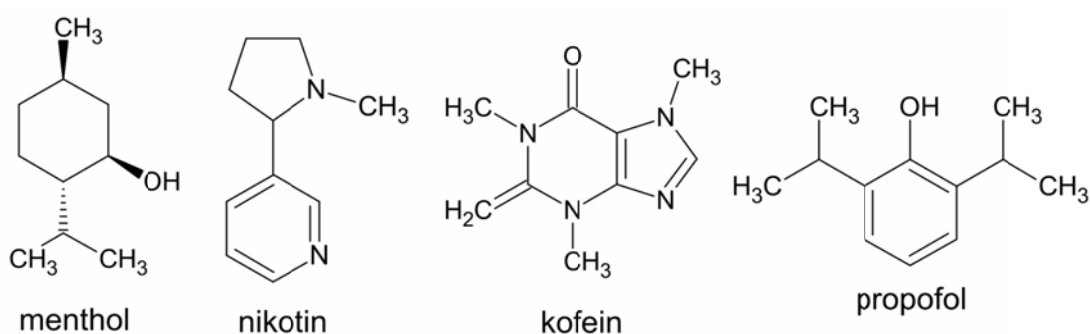
4.3.3 Aktivace neelektrofilními ligandy

Mimo elektrofilní činidla je TRPA1 aktivován také celou řadou látek neelektrofilní povahy, které interagují s receptorem prostřednictvím nekovalentních interakcí ve vazebné kapse kanálu (obr. č. 7). Menthol, látka známá pro své chladiivé účinky, byl nejprve považován za specifický aktivátor TRPM8 receptoru, později se ukázalo, že je také agonistou TRPA1 receptoru. Projevuje se bimodálním účinkem – nízké mikromolární koncentrace aktivují TRPA1, zatímco vyšší koncentrace vedou k reverzibilní inhibici receptoru [50]. Váže se do kapsy v transmembránové doméně mezi transmembránovými segmenty S5 a S6. Rezidua S876, T877 a G878 v této oblasti jsou klíčová pro citlivost mTRPA1 a hTRPA1 k mentholu [64].

Bimodálním účinkem se projevuje také nikotin. Topická aplikace nikotinu vede k podráždění kůže vlivem aktivace TRPA1, vyšší dávka však inhibuje receptor [65].

Druhově závislým aktivátorem TRPA1, účinkujícím vlivem nekovalentních interakcí, je kofein. Kofein aktivuje myší TRPA1, lidský ortholog však blokuje. Citlivost a modulace TRPA1 kofeinem je určena oblastí mezi T231 a D287 na N- konci. Mutací, jež v myším TRPA1 zaměnila M268 za prolin (který je na stejné pozici u lidského orthologu), byl změněn účinek kofeinu z aktivačního na inhibiční [14].

Paradoxně může být TRPA1 receptor aktivován a senzitivován anestetiky, například běžně užívaným propofolem. Intravenózní aplikace propofolu vyvolává intenzivní pocit bolesti [66]. Zároveň se může propofol podílet na senzitivaci jiných nociceptivních stimulů v postižené tkáni [67].



Obrázek č. 7: Struktura vybraných neelektrofilních agonistů TRPA1 receptoru, účinkujících prostřednictvím nekovalentních interakcí.

4.3.4 Aktivace teplem a chladem

Řada zástupců z rodiny TRP receptorů je aktivována změnami teploty, například vaniloidní TRPV receptory jsou aktivovány vyššími teplotami – prahové hodnoty pro aktivaci činí 33 °C u TRPV3, 43 °C u TRPV1 a 55 °C pro TRPV2 receptory. Naopak zástupce melastatinových receptorů, TRPM8, je u savců jedním z hlavních senzorů chladu s prahovou teplotou kolem 25 °C [23]. Aktivace TRPA1 teplem či chladem není způsobena jediným aminokyselinovým zbytkem, ale je důsledkem kooperativity několika funkčních domén receptoru, které konformačními změnami ovlivňují vrátkování kanálu. Charakter teplotní aktivace TRPA1 orthologů je silně druhově závislý.

Aktivace teplem byla prokázána u některých hadích, žabích, ještěřích a hmyzích TRPA1 orthologů [9, 39, 49, 68]. Porovnávání N-konců lidského (hTRPA1), octomilčího (dTRPA1) a chřestýšího (rsTRPA1) orthologu vedlo k určení oblasti způsobující aktivaci receptoru teplem. Jedná se o chřestýší 3. - 9. ankyrinový motiv a o 10. - 15. ankyrinový motiv orthologu octomilky a chřestýšího orthologu, které vykazují relativně vysokou sekvenční konzervovanost. Záměnou příslušných ankyrinových motivů u teplotně necitlivého lidského orthologu za výše zmíněné části dTRPA1 a rsTRPA1 proteinů bylo dosaženo citlivosti dané chiméry k vysokým teplotám [39]. Na aktivaci teplem se také podílí transmembránová část S6 a pórový helix mezi S5-S6 segmenty [69].

Metodami fluorescenčního snímání změn intracelulární koncentrace vápenatých iontů a elektrofyziologickou technikou *patch-clamp* bylo roku 2003 prokázáno, že myší ortholog TRPA1 lze v heterologním expresním systému aktivovat snížením teploty na 5-11 °C [8]. Na základě tohoto zjištění autoři vyslovili hypotézu, že TRPA1 iontový kanál sehraává úlohu chladového senzoru na nociceptivních neuronech. Následovaly další studie, v nichž se některým autorským týmům podařilo aktivovat chladem savčí TRPA1 v heterologních expresních systémech [6, 70], jiní autoři však aktivaci chladem neprokázali [39, 71].

Prozatím není objasněno, jakým mechanismem je TRPA1 aktivován chladem. Pomocí řady chimér potkaního a lidského TRPA1 bylo zjištěno, že transmembránové segmenty S5 a S5-S6 klička se podílejí na aktivaci kanálu nízkou teplotou. Bodovou mutací G878V na S5-S6 kličce došlo ke zncitlivění potkaního TRPA1 vůči chladu [71]. Je zajímavé, že odpovídající reziduum u hTRPA1 (G878) souvisí s aktivací

receptoru mentholem, látkou způsobující pocit chladu [64]. Testováním rozsáhlé knihovny 12 000 náhodných mutantních klonů mTRPA1 byly odhalena rezidua na AR6, jejichž mutace proměnila mTRPA1 na teplem aktivovaný receptor [72].

4.3.5 Modulace TRPA1 receptoru Ca^{2+} a Zn^{2+} ionty

Účinek agonistů TRPA1 lze mnohonásobně zesílit zvýšením koncentrace intracelulárních vápenatých iontů (efekt zvaný potenciace). Ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v intracelulárním prostoru dochází buď výlevem z endoplasmatického retikula, nebo vtokem extracelulárních vápenatých iontů TRPA1 kanálem. Například aplikace skořicového aldehydu (CA) na buňku se zvýšenou expresí hTRPA1 v prostředí bez Ca^{2+} iontů vyvolá jen částečnou a pomalou aktivaci, dosahující po 40 s přibližně 25% maximální možné odpovědi. Přidáním Ca^{2+} iontů do vnějšího prostředí dojde k okamžitému zvýšení pravděpodobnosti otevření kanálů, následovaném pomalou desenzitizací (T_{50} = doba, za kterou klesne amplituda na polovinu max. hodnoty ~ 30 s pro 2 mM Ca^{2+}) [3]. Potenciace a desenzitizace TRPA1 receptoru jsou dva na sobě nezávislé procesy [1].

Mechanismus a místo účinku Ca^{2+} iontů doposud nebyly zcela objasněny. Kupříkladu rsTRPA1 postrádá Ca^{2+} závislou desenzitizaci. V práci [39] zabývající se nalezením teplotně citlivé domény autoři vytvořili vložení analogické dsTRPA1 sekvence na N- konci do hTRPA1 dva chimérické konstrukty s odstraněnou Ca^{2+} -dependentní desenzitizací. Oblast překryvu vkládaných úseků (AR10 - AR11) tedy zřejmě obsahuje vazebné místo pro vápenaté ionty. Další potenciální místo účinku Ca^{2+} představuje skupina záporně nabitých aminokyselin na C- konci [48], efekt kalcia může být také zprostředkován aktivitou kalmodulinu, podílejícího se na regulaci jiných Ca^{2+} kanálů [73].

Jedním z dalších významných kationtů procházející pórem TRPA1 kanálu je zinek. TRPA1 receptor je aktivován Zn^{2+} kationty z intracelulární strany již při 10nM koncentraci. Mutace v selektivním filtru (D915A) zcela odstranila aktivaci Zn^{2+} i v přítomnosti saturující koncentrace CA. Testováním všech cysteinů a histidinů v TRPA1 struktuře pomocí cílené mutagenese a elektrofyziologických metod byla odhalena dvě cysteinová (C641, C1021) a jedno histidinové reziduum (H983), zodpovědná za vazbu Zn^{2+} kationtů [13].

4.4 Specifická úloha cysteinů ve funkci a struktuře membránových proteinů

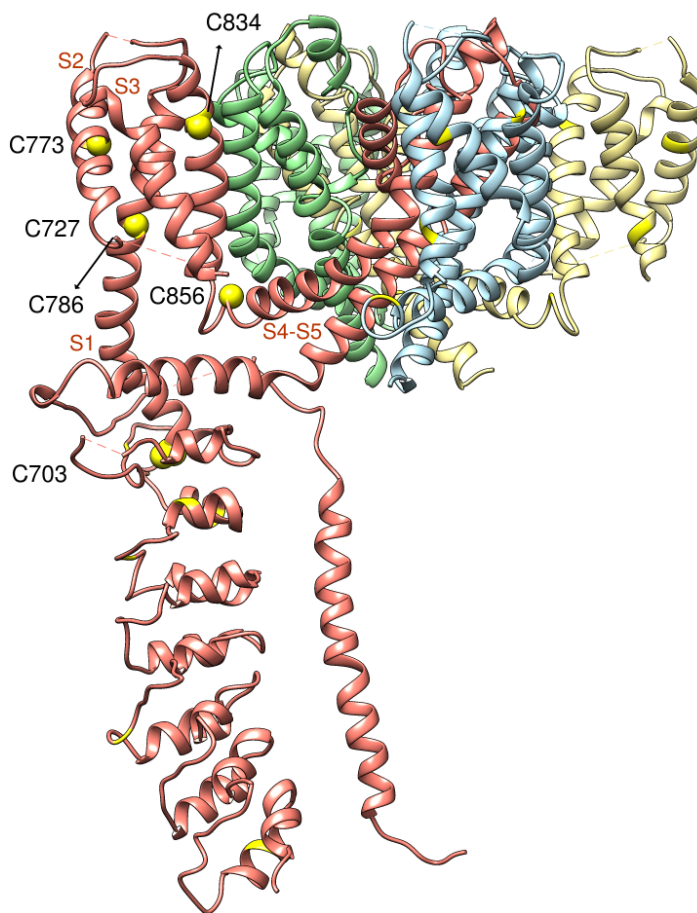
Jedním z nejčastěji využívaných metodických přístupů ke studiu aktivačních mechanismů membránových proteinů je stanovení účinku záměny aminokyselinových zbytků na místech s předpokládaným důležitým strukturním a funkčním významem. Záměna reziduí je obvykle zaměřena na zjištění, které fyzikálně-chemické vlastnosti dané aminokyseliny jsou důležité pro funkci proteinu, a substituce jsou zpravidla navrhovány s ohledem na velikost postranního řetězce, hydrofobicitu a strukturní úlohu podle tzv. Taylorovy klasifikace [74, 75]. Zatímco pro většinu aminokyselinových zbytků lze nalézt náhradu zachovávající velikost a alespoň zčásti charakter postranního řetězce, v případě cysteinových reziduí je náhrada jiným malým reziduem jen zřídka zcela tolerována.

Specifické vlastnosti cysteinových reziduí se často uplatňují v aktivních centrech a vazebných doménách proteinů, ve vazbě s kovovými ionty zajišťují důležité enzymatické funkce. Jejich funkční a strukturní úloha úzce souvisí s buněčnou lokalizací části proteinu, ve které se vyskytují. V extracelulárním prostředí jsou dvojice cysteinových reziduí v mnoha případech oxidovány a kovalentními vazbami mezi –SH skupinami stabilizují terciární strukturu v rámci jednoho polypeptidového řetězce nebo mezi různými řetězci. Pravděpodobnost vytváření disulfidických můstků je naopak velmi snížena v redukčním prostředí uvnitř buněk, také v oblasti buněčné membrány se disulfidické můstky jen zřídka vytvářejí.

Unikátní vlastnosti cysteinových zbytků jsou s výhodou využívány při studiu funkčních vlastností integrálních membránových proteinů, zejména iontových kanálů. Princip metody tzv. SCAM (substituted-cysteine accessibility method) spočívá v systematické záměně jednotlivých reziduí proteinu za cysteinový zbytek. Následnou aplikací látek reagujících s -SH skupinou pak lze určit, zda je daná oblast proteinu dostupná z vnitřního či vnějšího prostředí buněčné membrány a zda se orientace proteinu mění v souvislosti s konformačními změnami [76]. Záměnou dvojice reziduí za cysteinové zbytky lze za určitých okolností rovněž určit přibližnou vzdálenost jednotlivých oblastí proteinu, a tím ověřit jeho předpokládané topologické uspořádání. Strukturně funkční analýza TRPA1 je oproti jiným iontovým kanálům výrazně ztížena skutečností, že hlavním mechanismem aktivace tohoto kanálu je kovalentní modifikace

thiolových skupin konzervovaných cysteinových zbytků a mnoho reaktivních látek kanál přímo aktivuje. Není tedy možné využít ani metodu SCAM, ani přesně identifikovat cysteinová rezidua (28 u lidského TRPA1) uplatňující se přímo v aktivaci kanálu elektrofilními látkami, protože výsledný účinek substituce cysteinů nelze jednoznačně interpretovat. Dosud nejlépe charakterizovaným mechanismem aktivace TRPA1 je kovalentní modifikace thiolových skupin konzervovaných cysteinových zbytků v N-terminální cytoplasmatické oblasti, která spojuje ankyrinovou doménu s prvním transmembránovým helixem [16, 17].

Nedávná studie autorů Moparthy et al. [18] ukázala, že TRPA1 receptor lze aktivovat elektrofilními látkami i po odstranění téměř celého N-konce receptoru (Δ - 688), což znamená, že na aktivaci TRPA1 se podílejí i další cysteiny v transmembránové oblasti (6 cysteinů) a na cytoplasmatickém C-konci (3 cysteiny) (obr. č. 8). Potenciální úloha těchto cysteinových reziduí se tak stává mimořádně důležitou, nebyla však dosud systematicky studována.



Obrázek č. 8: Transmembránové cysteiny. Stuhlý model TRPA1 receptoru se zvýrazněnou podjednotkou. Žlutě jsou označena cysteinová rezidua. Žluté kuličky představují cysteiny v transmembránové oblasti receptoru.

5. Cíle práce

Předložená diplomová práce si klade za cíl:

- (1) Elektrofyziologickými a molekulárně-biologickými metodami charakterizovat aktivační parametry konstruktů cysteinů v transmembránové oblasti TRPA1 receptoru (C703, C727, C773, C786, C834, C856) a porovnat je s hodnotami získanými pro divoký typ TRPA1.
- (2) Zjistit, zda se některý z cysteinů v transmembránové oblasti účastní přímé aktivace prostřednictvím kovalentní modifikace elektrofilními substancemi.
- (3) Pomocí záměny dvojice vybraných reziduí ve 4. a 5. transmembránové doméně za cysteinové zbytky ověřit sterickou blízkost mezi podjednotkami.
- (4) Zasadit získané poznatky o funkčních vlastnostech transmembránových cysteinů do strukturního kontextu a určit úlohu transmembránových cysteinů.
- (5) Pokusit se navrhnout hypotézu, jejíž ověření by mohlo vést k objasnění citlivosti TRPA1 k depolarizačnímu napětí.

6. Materiál a metody

6.1 Chemikálie

- **Sigma-Aldrich, USA:** NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, glukosa, CsCl, NaOH, Na₂HPO₄, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová (HEPES), CsOH (99% roztok), KH₂PO₄, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA), adenosintrifosfát hořečnatý (MgATP), poly-L-lysin, Trizma base, ampicilin, skořicový aldehyd (CA), allylisothiokyanát (AITC), dimethylsulfoxid (DMSO)
- **PENTA, ČR:** kyselina octová 99%
- **Life Technologies, USA:** OPTI-MEM I médium, barvivo SYBR®Safe DNA Gel Stain
- **Agilent Technologies, USA:** QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, polymerasa Pfu Ultra
- **Geneaid Biotech, USA:** High Speed Plasmid Mini Kit, 10kB DNA Ladder, Loading dye
- **IBA GmbH, SRN:** transfekční činidlo „Magnet-assisted Transfection (MATra)“
- **SERVA Electrophoresis GmbH, SRN:** pepton z kaseinu, extrakt z kvasinek (yeast extract)
- **Invitrogen, USA:** trypsin
- **Biolife, IT:** Živný agar N°2

6.2 Biologický materiál

- lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (HEK 293T; LGC Standards, VB)
- cDNA hTRPA1 ve vektoru pCMV6-XL4 (OriGene, USA)
- plasmid pro zelený fluorescenční protein (dále GFP) ve vektoru pQBI 25 (TaKaRa)
- fetální bovinní sérum (FBS; PAN Biotech GmbH)
- kompetentní bakteriální buňky XL10-Gold kmene *E. coli* (Agilent Technologies, USA)

6.3 Přístroje a pomůcky

- Zesilovač *Axopatch-1D* (Axon Instruments)
- Invertovaný mikroskop *CKX41* (Olympus)
- Mikromanipulátor *MP-225* (Sutter Instrument)
- Horizontální tahač elektrod *P-1000* (Sutter Instruments Co.)
- Microforge *MF-830* (Narishige)
- Laminární box *VBH C2 (Steril)* (Schoeller Instruments)
- Inkubátor *MCO-36AIC* (Sanyo)
- Autokláv *Sanyo MAC 235EX* (Sanyo)
- Osmometr *Vapro* (Wescor)
- pH metr *3510 pH Meter* (Jenway)
- pH metr *Orion Star A111* (Thermo Scientific)
- Magnetická míchačka *1100 Hotplate & Stirrer* (Jenway)
- Magnetická míchačka *MR Hei-Tec* (Heidolph)
- Centrifuga *Rotilabo-mini centrifuge* (Carl Roth GmbH)
- Centrifuga *Mikro 120* (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga *Rotanta 460R* (Hettich Zentrifugen)
- Spektrofotometr *NanoDrop 1000* (NanoDrop Technologies)
- PCR Termocycler *Mastercycler personal* (Eppendorf)
- DNA sekvenátor *ABI 3730xl* (Applied Biosystems)
- Rotační inkubátor *Shaking Incubator NB-205* (N-Biotek)
- Elektroforetické zařízení *Consort Mini Electrophoresis Power Supply E143* (Sigma-Aldrich)
- Vortex *MS 2 Minishaker* (IKA)
- Automatické pipety (Gilson, Nichipet EX)

6.4 Roztoky

Extracelulární roztok (dále ECS) obsahoval 160mM NaCl, 2,5mM KCl, 1mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 10mM HEPES a 10mM glukosu. pH bylo upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,3. Osmolalita extracelulárního roztoku byla 320 mmol·kg⁻¹.

Pro plnění elektrod byl použit intracelulární roztok (dále ICS), který obsahoval 145mM CsCl, 5mM EGTA, 10mM HEPES, 3mM CaCl₂ a 2mM MgATP. pH bylo

upraveno pomocí CsOH na hodnotu 7,3. Osmolalita intracelulárního roztoku byla $290 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Pro účely měření chemické aktivace byly připraveny dva roztoky o různé 0mM a 2mM koncentraci Ca^{2+} iontů. Roztok s 0mM koncentrací Ca^{2+} iontů (dále ECS-0 Ca^{2+}) obsahoval 150mM NaCl, 10mM HEPES a 2mM HEDTA. Roztok o 2mM koncentraci Ca^{2+} kationtů (dále ECS-2 Ca^{2+}) obsahoval 150mM NaCl, 10mM HEPES a 2mM CaCl_2 . Oba roztoky byly několikrát připravovány v průběhu diplomové práce. pH roztoků bylo 7,3 a osmolalita se pohybovala mezi 290 a $330 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Roztoky agonistů TRPA1, skořicového aldehydu (CA) a allylisothiokyanátu (AITC), byly připravovány před pokusem z 0,1M zásobního roztoku v DMSO, uchovávaném při 4 °C. Měření bylo prováděno s 100 μM roztokem CA nebo AITC v ECS-0 Ca^{2+} .

Pro přípravu agarosového gelu byl použit TAE pufr o složení: 2M Trizma base, 1M kyselina octová, 50mM EDTA. Pro provedení elektroforézy byl pufr 50x zředěn.

Fosfátový pufr (PBS) obsahoval 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,47mM KH_2PO_4 a 4,3mM Na_2HPO_4 . pH bylo upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,3.

Versenův roztok obsahoval roztok fosfátového pufru PBS, 0,68mM EDTA a 87 μM trypsin (pH 7,3).

Pro pěstování kompetentních bakterií bylo použito kultivační médium (anglicky „Lysogeny Broth medium“, dále LB médium), obsahující 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) extrakt z kvasinek a 0,26M NaCl. Složky média byly rozpuštěny v deionizované vodě a směs byla 20 minut sterilizována při 121 °C.

6.5 Příprava DNA konstruktů

Cílená mutageneze byla provedena amplifikací plasmidu kódujícího hTRPA1 receptor za použití synteticky připravených primerů, nesoucích pozměněný kodon v místě mutace. Primery byly navrženy tak, aby celková délka byla kolem 30 párů bází, konce primeru obsahovaly jeden či dva cytosiny nebo guaniny, a vkládaná mutace se nacházela přibližně uprostřed primeru.

Sekvence primerů jsou uvedeny na str. 33. Červeně jsou označeny substituované báze, kodon kódující zaměněnou aminokyselinu je podtržen.

- **mutace C703A: TGT → GCT**

SENSE: 5'- CTC AAT CAT CCT GTG GCT AAA GAA TAT TTA C -3'
ANTISENSE: 5'- GTA AAT ATT CTT TAG CCA CAG GAT GAT TGA G -3'

- **mutace C703S: TGT → AGT**

SENSE: 5'- CTC AAT CAT CCT GTG AGT AAA GAA TAT TTA C -3'
ANTISENSE: 5'- GTA AAT ATT CTT TAC TCA CAG GAT GAT TGA G -3'

- **mutace C727A: TGT → GCT**

SENSE: 5'- GAA TTT AGG ATC TTA CGC TCT TGG TCT CAT AC -3'
ANTISENSE: 5'- GTA TGA GAC CAA GAG CGT AAG ATC CTA AAT TC -3'

- **mutace C727S: TGT → AGT**

SENSE: 5'- GAA TTT AGG ATC TTA CAG TCT TGG TCT CAT ACC -3'
ANTISENSE: 5'- GGT ATG AGA CCA AGA CTG TAA GAT CCT AAA TTC -3'

- **mutace C773A: TGT → GCT**

SENSE: 5'- CAT ATC TAA TAA AAA CTG CTA TGA TTT TAG TG -3'
ANTISENSE: 5'- CAC TAA AAT CAT AGC AGT TTT TAT TAG ATA TG -3'

- **mutace C773S: TGT → AGT**

SENSE: 5'- CAT ATC TAA TAA AAA CTA GTA TGA TTT TAG TG -3'
ANTISENSE: 5'- CAC TAA AAT CAT ACT AGT TTT TAT TAG ATA TG -3'

- **mutace C786A: TGC → GCC**

SENSE: 5'- GTA TAT TTG GGT ATG CCA AAG AAG CGG G -3'
ANTISENSE: 5'- CCC GCT TCT TTG GCA TAC CCA AAT ATA C -3'

- **mutace C786S: TGC → AGC**

SENSE: 5'- GTA TAT TTG GGT ATA GCA AAG AAG CGG G -3'
ANTISENSE: 5'- CCC GCT TCT TTG CTA TAC CCA AAT ATA C -3'

- **mutace C834A: TGT → GCT**

SENSE: 5'- CTG CAG TGG CAA GCT GGA GCA ATT GC -3'
ANTISENSE: 5'- GCA ATT GCT CCA GCT TGC CAC TGC AG -3'

- **mutace C834S: TGT → AGT**

SENSE: 5'- CTG CAG TGG CAA AGT GGA GCA ATT GC -3'
ANTISENSE: 5'- GCA ATT GCT CCA CTT TGC CAC TGC AG -3'

- **mutace C856A: TGT → GCT**

SENSE: 5'- GAT TTG AAA ATG CTG GAA TTT TTA TTG -3'
ANTISENSE: 5'- CAA TAA AAA TTC CAG CAT TTT CAA ATC -3'

- **mutace C856S: TGT → TCT**

SENSE: 5'- CAA AGA TTT GAA AAT TCT GGA ATT TTT ATT G -3'
ANTISENSE: 5'- CAA TAA AAA TTC CAG AAT TTT CAA ATC TTT G -3'

K účelům prozkoumání reziduí blízkých cysteinu C856 v S4-S5 linkeru byla vytvořena **dvojmutace E854C/K868C**. Nejprve byla vytvořena mutace E854C, která pak sloužila jako templát pro druhou mutaci K868C.

- **mutace E854C: GAA → TGT**

SENSE 5'- CTT CAA AGA TTT TGT AAT TGT GGA ATT TTT ATT G -3'
ANTISENSE 5'- CAA TAA AAA TTC CAC AAT TACA AAA ATC TTT GAA G -3'

- **mutace K868C: AAA → TGT**

SENSE 5'- GGA GGT AAT TTT G T G T TAC TTT GTT GAG G -3'
ANTISENSE 5'- CCT CAA CAA AGT ACA CAA AAT TAC CTC C -3'

Reakční směs pro PCR reakci o objemu 50 µl byla připravena podle návodu použitého kitu (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit):

1 µl mateřské DNA (200 mg/l)
1 µl sense primeru (25 µM)
1 µl antisense primeru (25 µM)
5 µl Buffer 10x
3 µl Quick solution
1 µl dNTPs (10 µM)
1 µl Pfu Ultra (DNA polymerasa)
37 µl destilované vody

Reakční směs byla umístěna do PCR zařízení. Parametry PCR reakce jsou uvedeny níže:

<u>95 °C</u>	<u>60 s</u>	
95 °C	50 s	denaturace dvojitě vázané DNA
51 °C	50 s	nasednutí primeru na DNA
<u>68 °C</u>	<u>16 min</u>	nasednutí DNA polymerasy
68 °C	10 min	
4 °C	nekonečno	

Cyklus PCR reakce byl opakován celkem 50x (2x25). V případě mutace C773A byla teplota nasednutí primeru nastavena na 49 °C. Po dokončení PCR reakce byl ke směsi přidán 1 µl dPN1 endonukleasy, výsledná směs byla inkubována v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

6.6 Horizontální elektroforéza

Přítomnost požadovaného PCR produktu byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu. Agarosový gel o 1% (w/v) koncentraci byl připraven smícháním 600 μ l neředěného TAE pufru s 0,3 g agarosy a 29,4 ml destilované vody. Pevná složka směsi byla rozpuštěna zahřátím v mikrovlnné troubě a po ochlazení tekoucí vodou k ní bylo přidáno 20 μ l 10 000x zředěného barviva SYBR®Safe DNA Gel Stain.

Do elektroforetické vany byl vložen ztuhlý gel, poté byla vana naplněna TAE puftrem zředěným 50x destilovanou vodou. Do jamiček byly přidány PCR vzorky, předem připravené smícháním 5 μ l PCR produktu s 2 μ l barviva Gel pilot loading dye. Pro určení velikosti DNA konstruktů byl použit 1 μ l DNA markeru smíchaný s 2 μ l barviva Gel pilot loading dye. Vzorky byly elektroforeticky rozděleny při napětí 90 V (50 minut). DNA v gelu byla vizualizována pomocí UV lampy v temné místnosti.

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

Kit pro transformaci, sestávající z XL10-Gold ultrakompetentních buněk a β -merkptoethanolu, byl uchováván při $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazicím boxu, pro transformaci byly obě složky rozmrazeny na ledu. Reakční směs byla připravena přidáním 30 μ l buněk a 2 μ l β -merkptoethanolu do předchlazené mikrozkušavky. Směs byla inkubována po dobu 10 minut za občasných míchání. Následně bylo přidáno 2 μ l výsledného PCR produktu a směs byla inkubována 30 minut na ledu. Po inkubaci byl proveden teplotní šok ponořením mikrozkušavek se směsí na 45 s do vodní lázně o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následnou inkubací na ledu po dobu 2 minut. Ke směsi bylo přidáno 200 μ l LB média předeřátého na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po hodinové inkubaci za stálého míchání (rotační inkubátor *Shaking Incubator NB-205*, 230 otáček za minutu (RPM), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) byl obsah zkumavky asepticky vyset na agarovou plotnu (koncentrace použitého živného agaru N^o2 byla $40\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) s ampicilinem o finální koncentraci $71,5\text{ }\mu\text{M}$. Plotna byla ponechána po dobu 16 hodin v zavěšené poloze v inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2).

Z plotny bylo po inkubaci sterilní špičkou odebráno několik samostatných a od sebe vzdálených kolonií. Ty byly přemístěny do zkumavky s 6 ml LB média a ampicilinem o koncentraci $14,3\text{ }\mu\text{M}$. Zkumavky byly 16 hodin inkubovány (rotační

inkubátor *Shaking Incubator-205*, 230 RPM, 37 °C) a poté centrifugovány (centrifuga *Rotanta 460R*, 4 °C, 6000 x g, 7 min). Supernatant byl odstraněn, z pelety byla v dalším kroku izolována plasmidová DNA.

6.8 Izolace plasmidové DNA a následné ověření sekvenací

Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí komerčně dodaného kitu „High Speed Plasmid Mini Kit“. Bakteriální peleta byla nejprve resuspendována v 200 µl pufru PD1 a po přenesení do mikrozkuřavky k ní bylo přidáno 200 µl PD2 pufru. Směs byla 10x promíchána a inkubována po dobu 2 minut. Následně bylo přidáno 300 µl pufru PD3, směs byla 10x promíchána. Vzniklá sraženina byla odstředěna centrifugací (*Mikro 120*, 16 000 x g, 25 °C; centrifugace v následujících krocích probíhaly za stejných podmínek) po dobu 3 minut. Supernatant byl přemístěn na kolonku a po 60s centrifugaci a odstranění filtrátu byla kolonka promyta 400 µl W1 puřrem. Po další 60s centrifugaci a odstranění supernatantu byla kolona promyta 600 µl promývacího pufru (Wash Buffer) a 60 s odstředována. Kolonka byla centrifugována 3 minuty dosucha. Na kolonku bylo aplikováno 50 µl elučního pufru, který působil 2 minuty, poté byla eluovaná DNA jímána během dvouminutové centrifugace do čisté mikrozkuřavky.

Koncentrace DNA byla stanovena měřením absorbance pomocí spektrofotometru *NanoDrop 1000* při vlnové délce 260 nm. Výsledný produkt izolace DNA byl ověřen sekvenací firmou Biogen Praha s.r.o..

6.9 Tkáňové kultury a transfekce

Pro transfekci DNA byly použity lidské embryonální buňky linie 293T (HEK 293T), které byly před použitím uchovávány zmražené v tekutém dusíku. Buňky byly kultivovány v médiu OPTI-MEM s 5% FBS na miskách pokrytých poly-L-lysinem s hustotou přibližně 180 000 buněk·cm⁻².

HEK 293T buňky byly přechodně transfekovány rekombinantní cDNA lidského TRPA1 receptoru nebo výše zmíněnými mutantními konstrukty ve vektoru pCMV6-XL4 (koncentrace 400 ng na misku) společně se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) ve vektoru pQBI 25 (koncentrace 200 ng na misku) pro vizualizaci pozitivně transfekovaných buněk. Jako transfekční činidlo byla použita reagentie

MATra (0,1 μ l na 100 ng DNA). K transfekční směsi bylo přidáno 50 μ l roztoku OPTI-MEM a po krátkém vortexování byla směs 20 minut inkubována při pokojové teplotě. Po inkubaci byla směs aplikována na konfluentně narostlé buňky, které byly na 15 minut umístěny do inkubačního boxu (5% CO₂, 37 °C) na permanentní magnet. Buňky byly pasážovány za použití roztoku PBS a Versenova roztoku s trypsinem a poté rozmístěny na sklíčka pokrytá poly-L-lysinem (jedno až tři sklíčka o průměru 12 mm, každé na misce o průměru 35 mm).

6.10 Elektrofyziologická technika *patch-clamp*

Patch-clamp (v překladu do češtiny „terčíkový zámek“) je elektrofyziologickou technikou, při níž jsou snímány proudy iontů z jednotlivých buněk, přičemž je membránový potenciál udržován na konstantní hodnotě, případně ho lze skokově nebo kontinuálně měnit. Pro měření elektrických odpovědí buněk metodou *patch-clamp* byly použity dvě elektrody: referentní argentchloridová, která je ponořena do roztoku s buňkami, a stříbrná elektroda pokrytá vrstvou AgCl umístěná ve skleněné trubičce z borosilikátového skla (vnitřní průměr 1,1 mm, vnějším průměr 1,6 mm), která má konec vytažený do velice úzkého hrotu (odpor hrotu je v rozmezí 3 – 6 M Ω) a je naplněna vodivým roztokem, mimikujícím intracelulární prostředí.

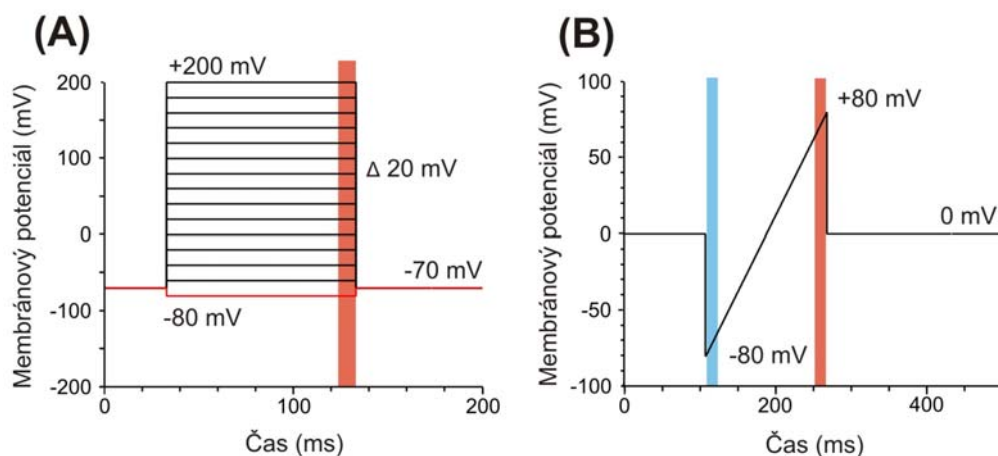
Proudové odpovědi byly snímány 24 až 48 hodin po transfekci v uspořádání „*whole-cell*“, umožňující měřit souhrnnou odpověď všech iontových kanálů přítomných na buněčné membráně. Fluorescenční lampou a filtrem byly na sklíčku zviditelněny GFP pozitivní buňky, vhodná, samostatně rostoucí buňka pak byla podrobena měření. Nejprve byla pomocí mikromanipulátoru navedena měřicí elektroda, naplněná ICS, těsně nad vybranou buňku. Aplikací podtlaku ústy přes gumovou hadičku připojenou k ústí mikroelektrody bylo vytvořeno spojení poskytující elektrický odpor v řádu G Ω . Další aplikací podtlaku byla nasátá membrána protržena, čímž došlo k propojení vodivého roztoku v elektrodě s cytoplasmou. Membránové proudy snímané zesilovačem *Axopatch 1-D* s použitím programu pCLAMP10 (Molecular Devices, USA) jsou výsledkem aktivity exprimovaných iontových kanálů na povrchu membrány. Sériový odpor byl obvykle menší než 10 M Ω a nebyl kompenzován. Teplota v místnosti byla mezi 22-25 °C. Pro rychlou výměnu složení roztoku a aplikaci agonistů byl použit aplikační systém s ústím aplikační kapiláry v blízkosti (cca 100 μ m) snímané buňky.

6.11 Napěťová a chemická aktivace

Ke studiu vlastností TRPA1 iontového kanálu byly použity dva napěťové protokoly. Aktivace depolarizačním napětím byla měřena pomocí napěťového protokolu, sestávajícím ze série patnácti 100 ms dlouhých napěťových skoků s postupně se zvyšující hodnotou membránového potenciálu od -80 mV do +200 mV po +20 mV (obr. č. 9.A). Pulz byl generován ve 200ms intervalech, během kterých byl udržován membránový potenciál na -70 mV.

Pro měření proudových odpovědí TRPA1 kanálu v přítomnosti agonisty byl používán rampový protokol (obr. č. 9.B). Membránový potenciál byl udržován na hodnotě 0 mV, každou sekundu byl aplikován lineární napěťový pulz od -80 mV do +80 mV rychlostí $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Před zahájením chemického protokolu byla buňka alespoň 20 s omývána extracelulárním roztokem bez vápenatých iontů. Během experimentu bylo pak aplikačním systémem měněno složení roztoku obklopujícího buňku:

0 s – 10 s	ECS-0Ca ²⁺
10 s – 50 s	100 μM CA/AITC v ECS-0Ca ²⁺
50 s – 60 s	ECS-0Ca ²⁺
60 s – 160 s	ECS-2Ca ²⁺



Obrázek č. 9: Stimulační napěťové protokoly. **(A)** Protokol pro určení napěťové charakteristiky lidského TRPA1 a mutantních konstruktů. Protokol je složen z 15-ti na sebe navazujících napěťových pulzů v rozmezí -80 mV až +200 mV, napětí se s následujícím skokem zvyšuje o 20 mV. V době mezi skoky je napětí udržováno na -70 mV. Průměrná hodnota membránového proudu je odečtena na konci pulzů (červená oblast). **(B)** Rampový protokol pro chemickou stimulaci, aplikovaný každou sekundu během měření. Napětí lineárně roste z -80 mV na +80 mV rychlostí $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. V době mezi skoky je napětí udržováno na 0 mV. Průměrná hodnota membránového proudu je odečtena na -80 mV (modrá oblast) a +80 mV (červená oblast).

6.12 Hodnocení záznamů a statistická analýza

Naměřená data byla analyzována programem Clampfit 10.2 (Molecular Devices), pro statistické vyhodnocení a tvorbu grafů byl použit program SigmaPlot 10.0 (Systat Software).

Vyhodnocení proudově-napěťové charakteristiky

Hodnoty amplitudy membránového proudu (I) byly získány zprůměrováním naměřeného proudu na konci pulzu, kdy se aktivační fáze blíží rovnovážnému stavu (95 - 99 ms, obr. č. 9.A na str. 38), a zobrazeny v závislosti na příslušném membránovém potenciálu (I/V závislost). Pro každý záznam byl v programu Clampfit 10.2 odhadnut reverzní membránový potenciál V_{rev} (membránový potenciál, při kterém je celkový tok iontů skrz membránu nulový) proložením pěti bodů I/V závislosti v okolí předpokládaného průsečíku s osou v polynomicou funkcí 4. řádu:

$$f(x) = ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e$$

$$f(V_{rev}) \cong 0$$

Pro účely kvantitativního porovnání záznamů mezi sebou je hodnota membránového proudu převedena na elektrickou vodivost buňky, která se získá ze vztahu:

$$G = \frac{I}{(V - V_{rev})}$$

Závislost vodivosti buňky na membránovém potenciálu (G/V charakteristika) umožňuje určit stav saturace iontových kanálů během aktivace. V některých případech byla testována možnost proložení G/V závislosti Boltzmannovou funkcí:

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

kde G_{max} je maximální dosažitelná vodivost buňky; G_{min} je minimální vodivost; F je Faradayova konstanta ($F = 96\,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$); v je napětí; $V_{1/2}$ představuje napětí, při kterém vodivost dosahuje poloviční hodnoty svého maxima; R zastupuje univerzální plynovou konstantu ($R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K} \cdot \text{mol}^{-1}$), z je vrátkovací náboj (anglicky „gating charge“) a T je absolutní teplota [7,77]. Průměrné hodnoty a střední chyby průměru veličiny $V_{1/2}$ lidského a mutantního TRPA1 byly vzájemně porovnávány.

Vyhodnocení chemicky vyvolaných proudů

Hodnoty membránového proudu během chemického protokolu na -80 mV a +80 mV byly odečteny z lineárního napětového pulzu jako průměr proudu v 5ms úseku při zvoleném membránovém potenciálu (obr. č. 9.B na str. 38). Časové závislosti membránového proudu buněk na obou potenciálech byly po vyřazení atypických záznamů s odlehlými hodnotami zprůměrovány a společně se středními chybami průměru vyneseny do grafu. Pokud během experimentu povolil spoj mezi ústím mikroelektrody a buněčnou membránou, byla část záznamu s výrazným podílem nescifických proudů nahrazena poslední naměřenou hodnotou proudu před povolením.

Z časových závislostí byly na obou potenciálech odečteny maximální hodnoty proudu během chemické aktivace a jejich vzájemný podíl, dále hodnota maximální amplitudy proudu během aplikace ECS-2Ca²⁺ a doba, za kterou bylo tohoto maxima dosaženo. K porovnání míry potenciace studovaných kanálů byl použit podíl proudu vyvolaného Ca²⁺ ionty a aplikací agonisty.

Pro popis kinetiky aktivace agonisty o koncentraci 100 μM byl použit parametr $T_{50(on)}$, určující dobu, za kterou během aktivace dosáhne membránový proud polovinu maxima. Obdobně byla popsána kinetika inaktivace kanálů v přítomnosti 2mM Ca²⁺ časem $T_{50(off)}$, označující dobu od maximální odpovědi na extracelulární Ca²⁺, za kterou proud poklesne na poloviční hodnotu. Oba časy jsou vztaženy vůči bazálnímu membránovému proudu (průměrná proudová odpověď před aplikací agonisty v čase 0 - 8 s) jako k nulové hodnotě.

Všechny určené hodnoty jsou uvedeny ve tvaru:

průměr ± střední chyba průměru (n = počet měření)

Statistické porovnávání průměrných hodnot parametrů bylo vyhodnoceno pomocí párového t-testu, případně pomocí Mann-Whitneyho testu, v programu SigmaPlot 10.0 s hladinou významnosti testu $P = 0,05$.

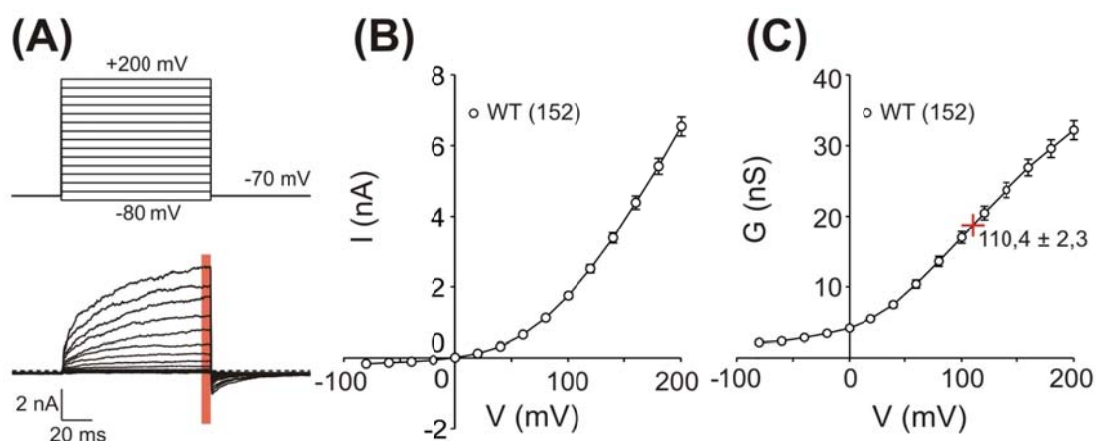
7. Výsledky

7.1 Charakterizace vlastností divokého typu TRPA1 receptoru

7.1.1 Stimulace TRPA1 receptoru depolarizačním napětím

Divoký typ lidského TRPA1 receptoru (dále WT) byl exprimován v HEK 293T buněčné linii. Pozitivně transfekované buňky byly rozpoznány koexpresí GFP proteinu, samotná přítomnost cílového proteinu byla ověřena aplikací stimulačního protokolu, sestávajícího z 15-ti napěťových pulzů v rozmezí od -80 do +200 mV (obr. č. 9.A na str. 38 a obr. č. 10.A). WT je aktivován depolarizačním membránovým potenciálem od +100 mV, lze proto rozlišit několikanásobně zvýšenou proudovou odpověď buněk, exprimujících ve velkém množství TRPA1 kanály, od netransfekovaných buněk s pouze nativními kanály na membráně.

Z proudů odečtených na konci napěťových pulzů byla sestrojena proudová napěťová charakteristika (I/V) (obr. č. 10.B), která byla dále převedena na závislost vodivosti na aplikovaném napětí (G/V) (obr. č. 10.C). Rekombinantně exprimovaný hTRPA1 kanál je aktivovaný depolarizačním napětím i bez přítomnosti agonisty. Maximální proudová odpověď při +200 mV dosahuje $6,5 \pm 0,3$ nA ($n = 152$), což



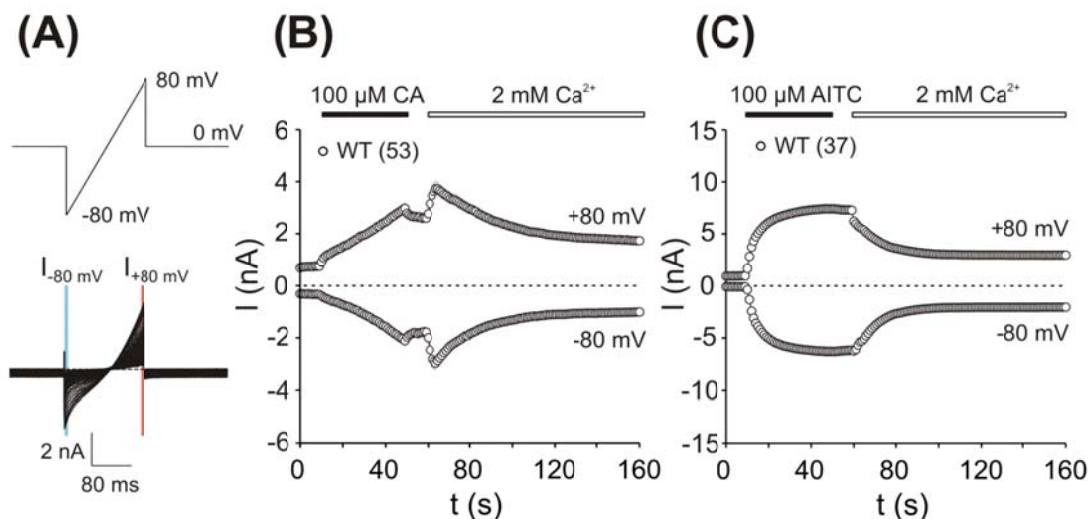
Obrázek č. 10: Aktivace divokého typu hTRPA1 receptoru depolarizačním napětím. **(A)** *Nahoře* - Napěťový protokol ke stimulaci transfekovaných buněk, sestávající ze série 15-ti napěťových pulzů v rozsahu od -80 mV do +200 mV, mezi jednotlivými pulzy je udržován membránový potenciál na -70 mV. *Dole* - Vyvolané proudové odpovědi exprimovaných iontových kanálů na membráně měřené buňky. Na konci pulzů je odečtena maximální amplituda proudu při daném potenciálu (červeně). **(B)** Průměrná I/V charakteristika TRPA1 iontového kanálu ($n = 152$). **(C)** Průměrná G/V charakteristika TRPA1 iontového kanálu. Červeně je vyznačeno poloviční účinné napětí $V_{1/2}$ v mV ($n = 121$).

odpovídá vodivosti $32,2 \pm 1,3$ nS ($n = 152$). Stanovené poloviční účinné napětí $V_{1/2}$ dosahuje $110,4 \pm 2,3$ mV ($n = 121$).

7.1.2 Chemická stimulace TRPA1 receptoru

Účinek agonistů a extracelulární koncentrace vápenatých iontů byl testován pomocí rampového protokolu (obr. č. 9.B na str. 38 a obr. č. 11.A) aplikovaného každou sekundu, v průběhu experimentu bylo měněno složení roztoku omývajících sledovanou buňku. Z naměřených amplitud membránových proudů na -80 mV a $+80$ mV byl sestrojen časový průběh proudu za různých experimentálních podmínek.

V případě skořicového aldehydu (CA) jako agonisty byla použita koncentrace 100 μ M, což je lehce přes poloviční účinnou koncentraci ($EC_{50} = 61 \pm 9$ μ M [6]). Během 40s chemické stimulace CA bez přítomnosti Ca^{2+} iontů rostly membránové proudy lineárně až na hodnotu $3,0 \pm 0,2$ nA ($n = 61$) na $+80$ mV a v průměru nižší hodnotu $-2,1 \pm 0,2$ nA ($n = 61$) na -80 mV (obr. č. 11.B). Kinetiku aktivace se stanovit nepodařilo vzhledem k tomu, že ani na konci stimulace nebylo dosaženo stavu blízkého saturaci. Aktivace receptorů kovalentní modifikací přetrvala i po odmytí CA.



Obrázek č. 11: Chemická aktivace hTRPA1 receptoru. (A) Rampový protokol, tvořený lineárním pulzem, aplikovaný každou sekundu na měřenou buňku. Z proudových odpovědí byly odečteny amplitudy na -80 mV (modře) a na $+80$ mV (červeně) pro další analýzu. Snímané proudy byly převedeny na časový průběh membránových proudů na kladném a záporném potenciálu. Během experimentu byla buňka omývána roztokem ECS-0Ca²⁺, poté byl aplikován agonista (černý panel): skořicový aldehyd (CA) (B) nebo allylisothiokyanátu (AITC) (C) a následně roztoku ECS-2Ca²⁺ (bílý panel).

V průměru během $7,3 \pm 1,1$ s ($n = 55$) od počátku aplikace roztoku ECS-2Ca^{2+} došlo k výraznému zvyšování membránových proudů na kladném i záporném potenciálu, dokud nebylo dosaženo maxima potenciace. Ca^{2+} ionty potencují WT v průměru $1,6 \pm 0,1$ -krát ($n = 55$) na $+80$ mV a o něco více na záporném potenciálu: $2,1 \pm 0,1$ -krát ($n = 56$). Po dosažení maximální amplitudy proudu následovala pozvolná inaktivace WT kanálů a snižování jejich vodivosti, rychlost inaktivace byla charakterizována časy $\tau_{50}(\text{off}) = 22,7 \pm 2,8$ s ($n = 48$) na $+80$ mV a $15,2 \pm 2,3$ s ($n = 49$) na -80 mV. Inaktivace na kladném potenciálu je v průměru 1,7-krát rychlejší.

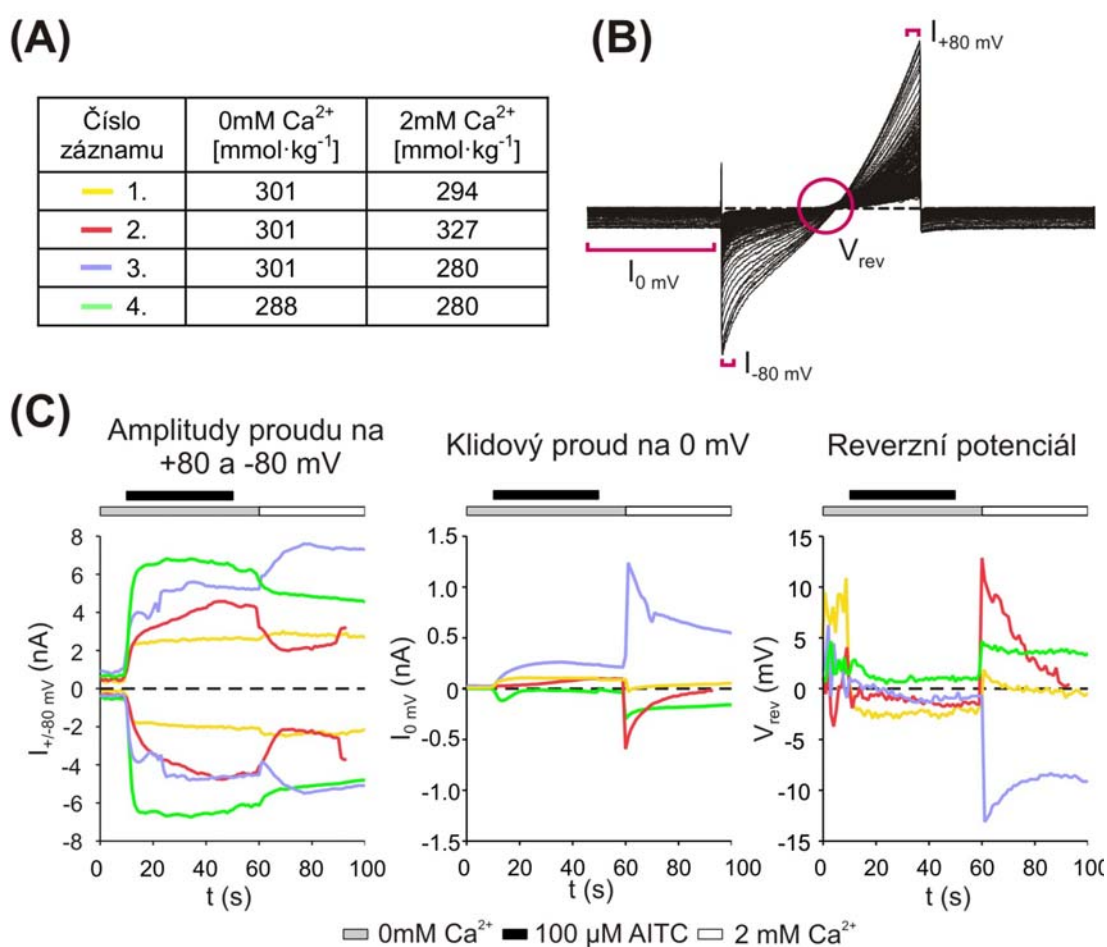
K lepšímu pochopení vlastností TRPA1 receptoru byl jakožto další elektrofilní agonista zvolen allylisothiokyanát (AITC) s nižší poloviční účinnou koncentrací $\text{EC}_{50} = 22 \pm 3$ μM [6]. Přidání $100\mu\text{M}$ AITC vyvolalo rapidní nárůst membránových proudů, popsáný časovou konstantou $\tau_{50}(\text{on})$ ($4,6 \pm 0,7$ s ($n = 42$) na -80 mV a $3,7 \pm 0,5$ s ($n = 42$) na $+80$ mV) (obr. č. 11.C na str. 42). Během chemické stimulace bylo dosaženo saturace TRPA1 receptoru, kdy je kanál plně otevřen a ionty jím procházejí stejnou měrou nezávisle na znaménku membránového potenciálu. Maximální amplitudy proudu byly oproti CA vyšší: $7,4 \pm 0,5$ nA ($n = 42$) na $+80$ mV a $-6,8 \pm 0,5$ nA ($n = 42$) na -80 mV. Vápenaté ionty procházející dovnitř buňky již dále nepotencovaly aktivovaný TRPA1, nýbrž ihned inaktivovaly kanál za postupného snížení proudů ($\tau_{50}(\text{off}) = 11,9 \pm 1,2$ s ($n = 25$) na -80 mV a $14,3 \pm 2,6$ s ($n = 21$) na $+80$ mV).

7.1.3 Závislost chemické odpovědi na osmolalitě aplikovaných roztoků

Výše uvedené výsledky jsou ve shodě s ostatními autory – publikovanými daty naší laboratoře i ostatních autorů. Inaktivace CA odpovědí byla v našich pokusech rychlejší, než byla popsána v publikaci Sura et al., 2012 [48], což mohlo vzniknout použitím jiné osmolality extracelulárního roztoku obsahujícího 2mM Ca^{2+} (290 versus 300).

Při experimentech s agonistou je zvolen průběh napěťového rampy a prodleva mezi jednotlivými rampy tak, aby byl každý další záznam co nejméně ovlivněn tím předchozím a receptory byly v klidovém stavu dříve, než budou opětovně aktivovány. U řady pokusů s AITC jsme však během aplikace agonisty pozorovali pozvolný nárůst

či pokles membránového proudu v době, kdy napěťový ramp nebyl aplikován, tedy ve fázi, kdy je buňka udržována na membránovém potenciálu 0 mV (obr. č. 12.C vlevo a uprostřed). Tento dodatečný proud měl tendenci se skokově posunout při změně roztoku omývajícího sledovanou buňku. Zjistili jsme, že v průběhu aktivace se významně zvyšuje citlivost TRPA1 kanálů na mírné změny osmolality vnějších roztoků, které ovlivňovaly míru a směr posunu reverzního potenciálu (viz obr. č. 12.C vpravo) Posun hodnoty membránového proudu byl aditivní k proudům vyvolaným samotným napěťovým rampem a odrážel srovnatelnou změnu reverzního potenciálu.



Obrázek č. 12: (A) Vybrané záznamy průběhu chemického protokolu AITC s různými osmolalitami použitých roztoků. (B) Z proudových odpovědí byly odečteny membránové proudy během rampového pulzu ($I_{-80\text{ mV}}$, $I_{+80\text{ mV}}$), klidový proud před aplikací rampového pulzu ($I_{0\text{ mV}}$) a reverzní potenciál, při kterém je měřený proud nulový (V_{rev}). (C) Grafy získaných výše uvedených hodnot pro vybraná měření. Změna osmolality aplikovaných roztoků vyvolala skokový posun klidového proudu a reverzního potenciálu. Legenda ke grafům je uvedena dole.

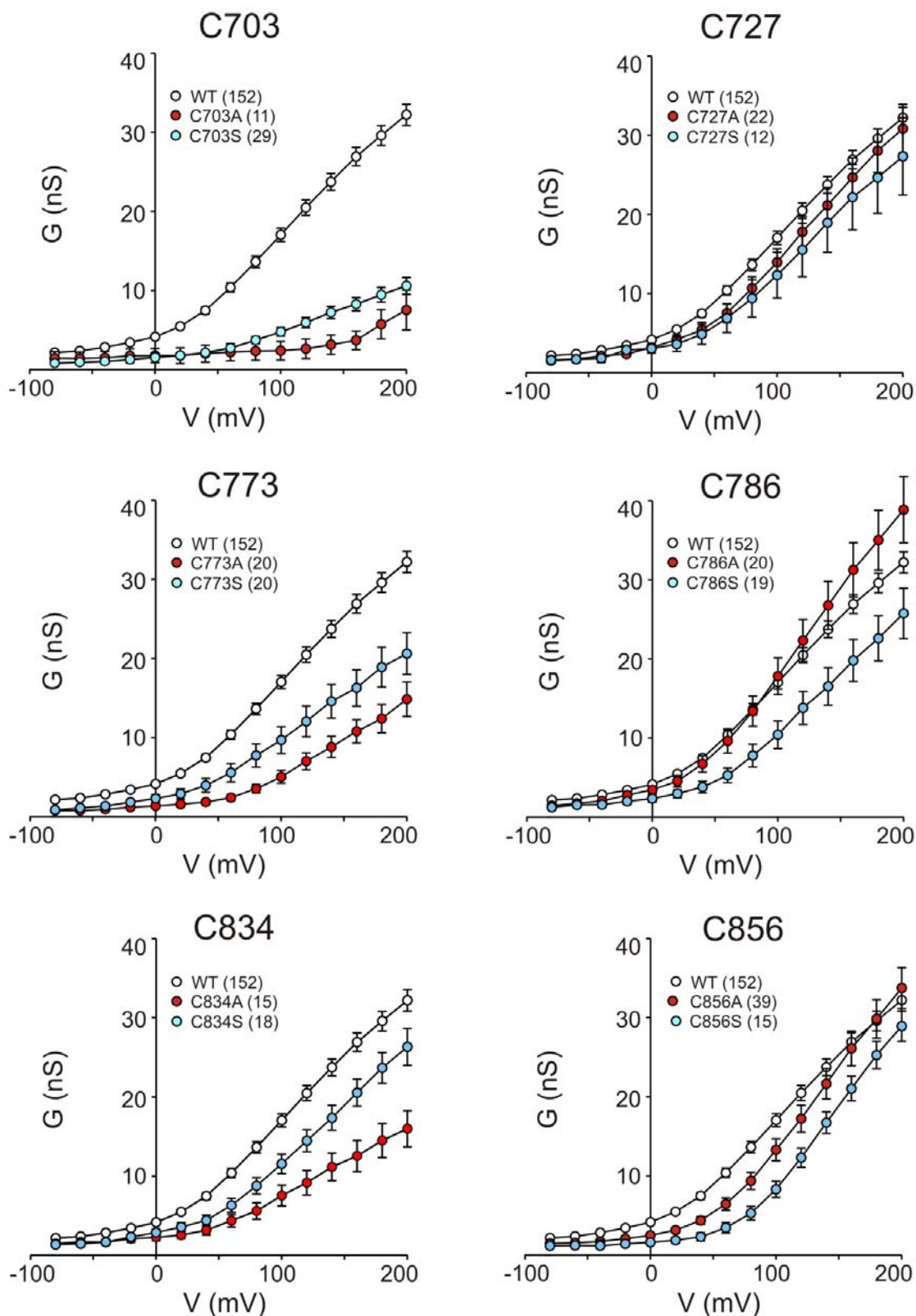
Rozdíly v Ca^{2+} inaktivaci by tak mohly být důsledkem odlišných hodnot osmolalit dvou po sobě následujících roztoků. Relativní parametry, které jsme dále použili pro vyhodnocení aktivity TRPA1 konstruktů, však nebyly tímto rozdílem ovlivněny.

7.2 Charakterizace mutantních konstruktů transmembránových cysteinů

Cysteinová rezidua v transmembránové oblasti TRPA1 receptoru se mohou potenciálně účastnit aktivace elektrofilními činidly prostřednictvím kovalentní modifikace, jejich úloha ale může spočívat také ve stabilizaci struktury nebo zajištění správné funkce proteinu. Za účelem rozpoznání významu těchto cysteinů byly pomocí cílené bodové mutagenese sestrojeny konstrukty, ve kterých došlo k záměně vybraných reziduí za hydrofobní alanin nebo polární serin. V obou případech je potenciální místo pro kovalentní modifikaci odstraněno při zachování velikosti postranního řetězce. Mutantní konstrukty byly studovány pomocí výše zmíněných napěťových protokolů z hlediska modulace depolarizujícím napětím, elektrofilními agonisty a extracelulárními Ca^{2+} kationty.

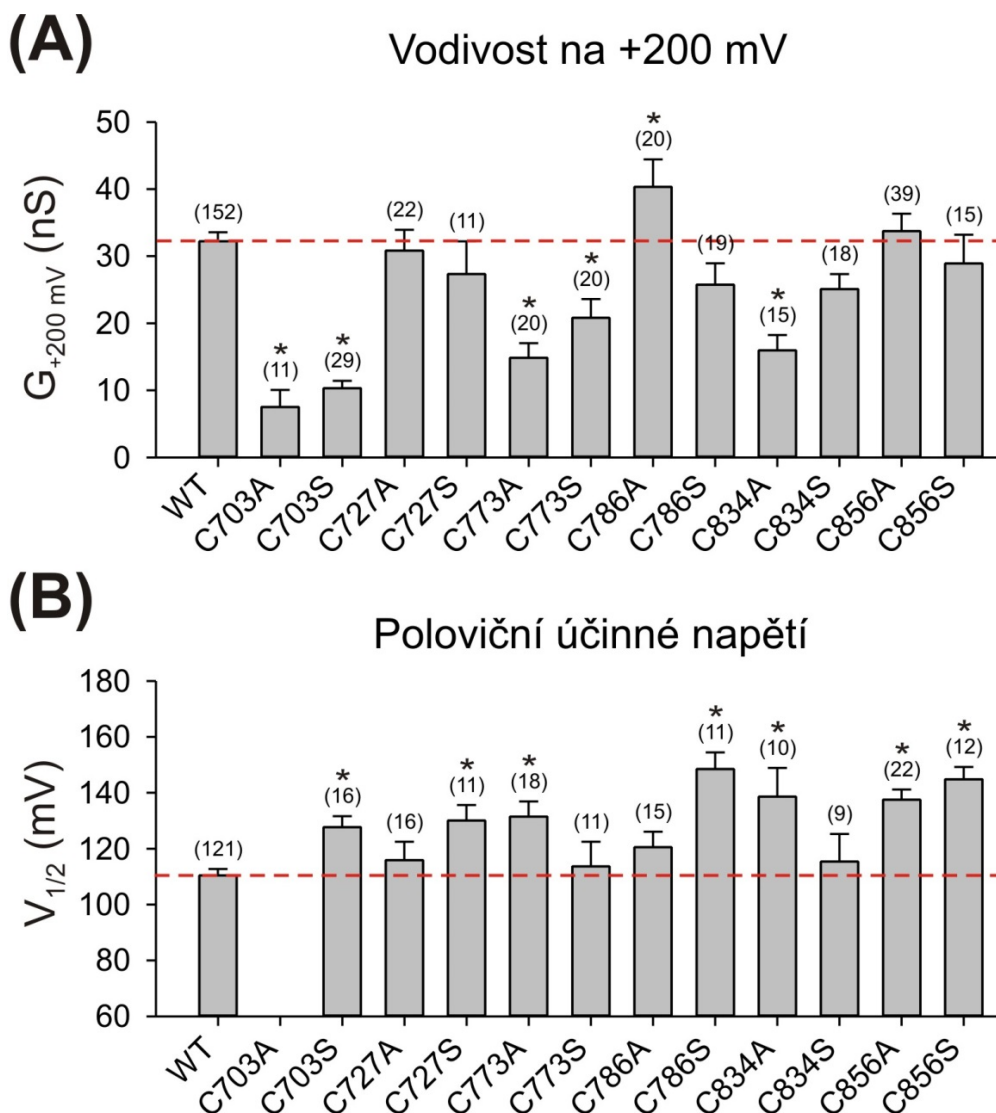
7.2.1 Depolarizující napětí

Mutantní konstrukty byly až na mutaci C703A aktivovány depolarizujícím napětím, stimulace napěťovými skoky poskytovala proudové odpovědi s charakteristickým vějířovým tvarem. Získané G/V závislosti mutantů jsou uvedeny na obr. č. 13. na str. 46, průměrné hodnoty vodivosti na +200 mV na obr. č. 14.A na str. 47. Vodivost mutace C703 za serin byla oproti WT také významně nižší ($G_{+200\text{ mV}} = 10,6 \pm 1,1 \text{ nS}$ ($n = 29$)), stejně tak jako obě mutace rezidua C773, a konstrukt se zaměněným C834 za alanin. Mutace C834S a C786S sice dosahovaly nižší vodivosti při depolarizujícím membránovém potenciálu, tento pokles však nebyl statisticky významný. Buňky exprimující konstrukty obsahující mutace cysteinu C727 poskytovaly obdobnou vodivost na depolarizačním napětí jako WT, v případě C786A byly naměřené hodnoty vodivosti v průměru dokonce vyšší než kontrolní divoký typ ($G_{+200\text{ mV}} = 38,9 \pm 4,2 \text{ nS}$ ($n = 20$)). Konstrukty se substituovaným C856 vykazovaly obdobnou vodivost na kladném membránovém potenciálu, avšak na záporných potenciálech je vodivost kanálů výrazně snížena.



Obrázek č. 13: Vodivostně-napěťové charakteristiky mutantních konstruktů cysteinových reziduí v transmembránové oblasti. Jednotlivé průměrné hodnoty vodivosti divokého typu (WT, bílá), společně s mutacemi za alanin (červeně) a serin (modře) jsou vzájemně spojeny lomenou čarou. Počet měření je uveden v závorce v legendě ke grafům.

Získané hodnoty vodivosti jsou silně ovlivněny mírou exprese iontových kanálů. Pro stanovení citlivosti na napětí je užitečné určit poloviční účinné napětí $V_{1/2}$, které popisuje spíše tvar G/V závislosti a je méně závislé na velikosti vodivosti (obr. č. 14.B). Parametr $V_{1/2}$ byl významně zvýšen u mutací C703S ($V_{1/2} = 127,7 \pm 3,9$ mV ($n = 16$)), C773A ($V_{1/2} = 131,5 \pm 5,4$ mV ($n = 18$)) a C834A ($V_{1/2} = 139 \pm 10$ mV ($n = 10$)), které měly zároveň sníženou vodivost na +200 mV, což naznačuje možné narušení napěťového senzoru. U mutací C727S a C786S je $V_{1/2}$ posunuto též ke kladným



Obrázek č. 14: Proudové odpovědi divokého typu (WT) a mutantních konstruktů na depolarizační napětí. **(A)** Průměrné hodnoty vodivosti WT a mutantních konstruktů transmembránových cysteinů na +200 mV. **(B)** Hodnoty polovičního účinného napětí WT a mutantních konstruktů transmembránových cysteinů. Počty měření jsou uvedeny v závorce nad středními chybami průměru. Signifikantní rozdíl parametru oproti WT je označen hvězdičkou.

hodnotám membránového potenciálu, ačkoliv jejich vodivost nabývá hodnot srovnatelných s WT. Totéž platí i pro obě mutace C856A ($V_{1/2} = 137,5 \pm 3,7$ mV ($n = 22$)) a C856S ($V_{1/2} = 144,8 \pm 4,4$ mV ($n = 12$)).

7.2.2 Chemická stimulace – skořicový aldehyd

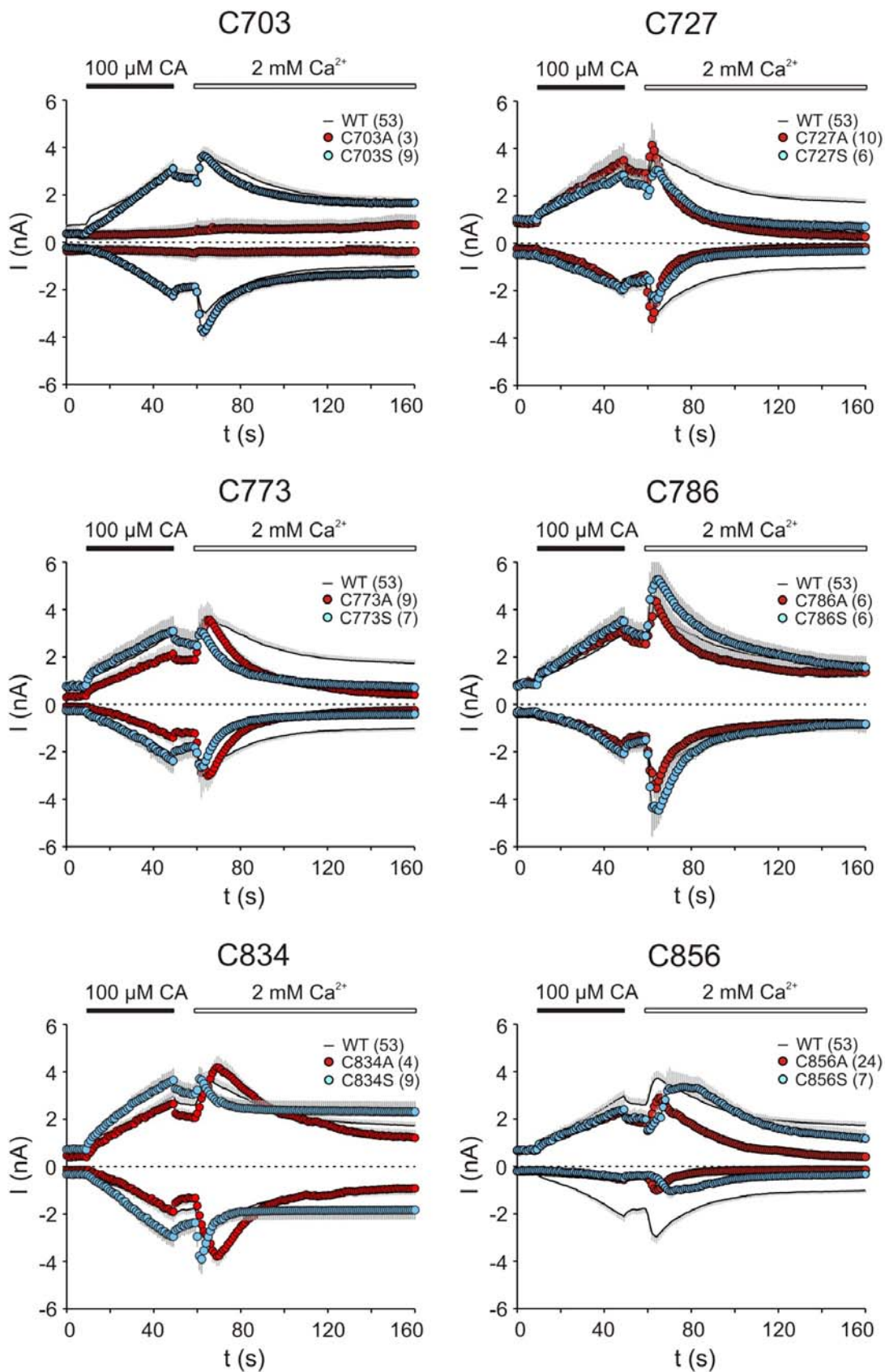
Časové průběhy aktivace TRPA1 kanálu a mutantních konstruktů agonistou a následná modulace Ca^{2+} ionty jsou uvedeny na obr. č. 15 na str. 49, průměrné hodnoty maximální proudové odpovědi na skořicový aldehyd (CA) jsou uvedeny na obr. č. 16.A na str. 50.

Aktivace 100 μ M CA

Mutace C703A necitlivá vůči depolarizačnímu napětí nebyla aktivována CA, naopak maximální proudová odpověď serinové substituce cysteinu C703 na CA ($2,9 \pm 0,4$ nA ($n = 14$) na +80 mV, $-2,2 \pm 0,3$ nA ($n = 14$) na -80 mV) byla i přes narušenou napětíovou citlivost srovnatelná s WT. Také mutace reziduí C727, C773, C786 a C834 se aktivací CA velice podobaly divokému typu TRPA1 receptoru. Aktivace mutace C773A sice byla zhruba o třetinu nižší na kladném i záporném potenciálu, tento rozdíl ovšem nebyl statisticky významný. Obě mutace cysteinu C856 vykazovaly výraznou závislost proudových amplitud vyvolaných aktivací CA na polaritě membránového potenciálu. Ačkoliv oba konstrukty dosahovaly na +80 mV maximální proudové odpovědi jako WT ($2,6 \pm 0,3$ nA ($n = 25$) pro C856A a $2,4 \pm 0,5$ nA ($n = 7$) pro C856S), na -80 mV byla aktivita kanálů několikanásobně potlačena (proudy $-0,7 \pm 0,1$ nA ($n = 25$) pro C856A a $-0,5 \pm 0,1$ nA ($n = 7$) pro C856S) (viz obr. č. 16.B na str. 50).

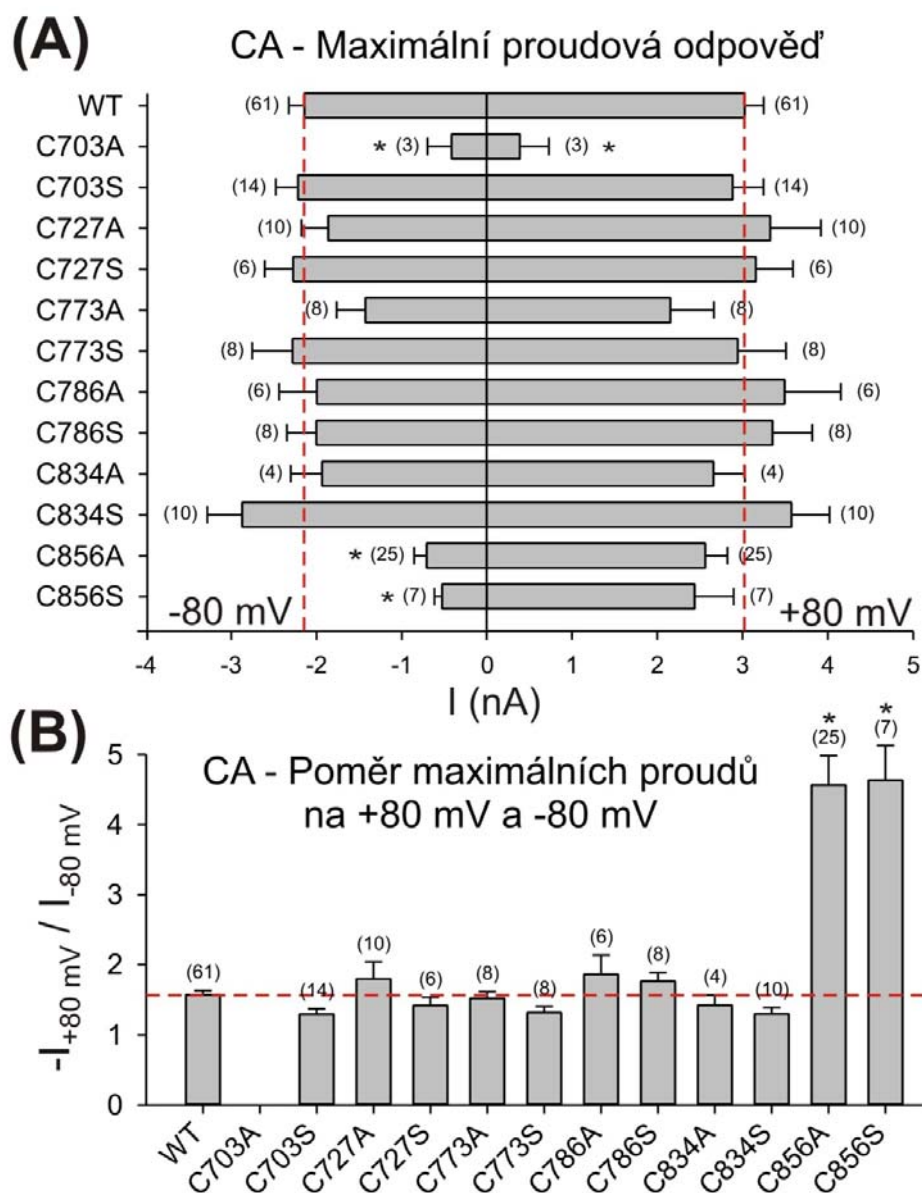
Potenciace 2mM Ca^{2+}

Aplikace roztoku ECS-2 Ca^{2+} u všech funkčních mutantních konstruktů nárůst membránových proudů na kladném i záporném potenciálu – tzv. potenciaci. Následný pozvolný pokles proudů spojené se snížením aktivity receptorů označujeme jako inaktivaci. Pro všechny mutace byla vypočtena průměrná míra potenciace Ca^{2+} ionty (obr. č. 17 na str. 51). Mutace C703S se mírou a kinetikou modulace vápenatými ionty významně nelišila od WT. Potenciace Ca^{2+} ionty na +80 mV byla snížena u mutací

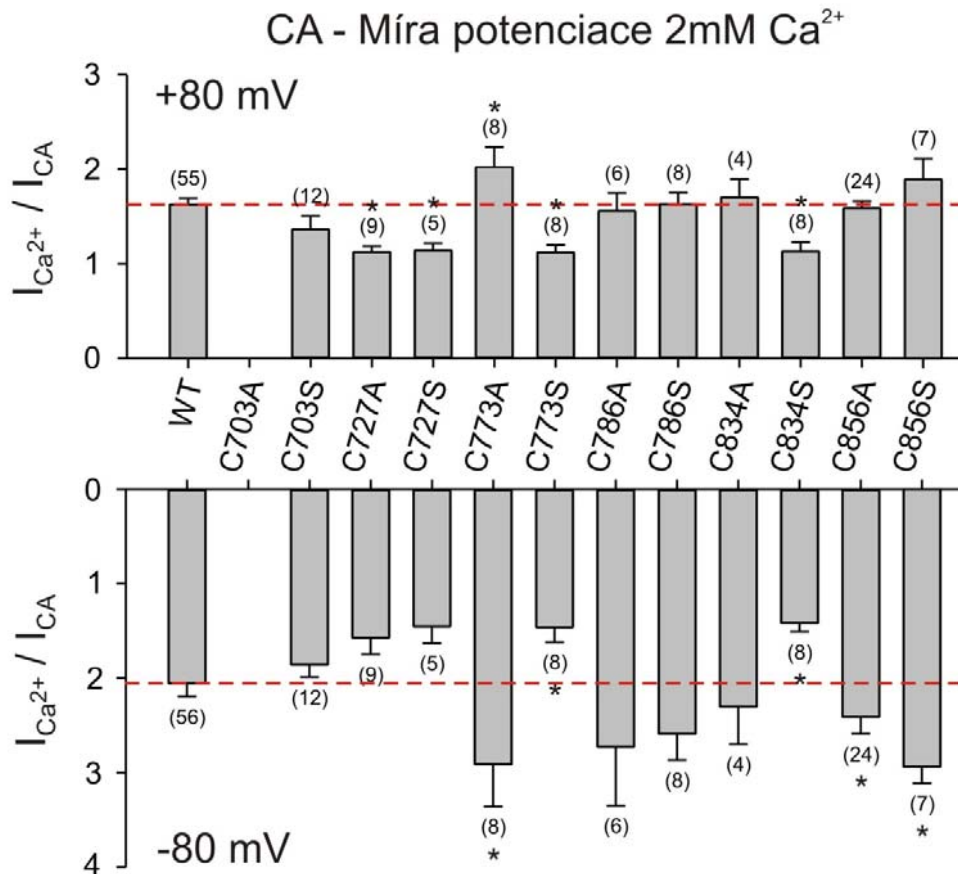


Obrázek č. 15: Průměrné odpovědi mutací transmembránových cysteinů TRPA1 receptoru na chemický protokol - stimulace skořicovým aldehydem (CA). Pro srovnání divoký typ (WT, černá křivka).

C727A ($1,2 \pm 0,1$ (n = 9)), C727S ($1,1 \pm 0,1$ (n = 5)), C773S ($1,1 \pm 0,1$ (n = 8)) a C834S ($1,1 \pm 0,1$ (n = 8)), v případě mutací C773S a C834S došlo ke statisticky významnému snížení potenciace i na záporném membránovém potenciálu. Změna potenciace byla u výše zmíněných mutantů doprovázena kratším časem potřebným pro dosažení maximální hodnoty proudu. Naopak mutant C773A, vykazující lehce sníženou proudovou odezvu na CA, dosáhl v přítomnosti 2mM Ca^{2+} stejných proudů jako WT.



Obrázek č. 16: (A) Maximální hodnota dosaženého membránového proudu divokého typu (WT) a mutantních konstruktů během stimulace 100 μM skořicovým aldehydem (CA) na kladném (vpravo) a záporném (vlevo) membránovém potenciálu. (B) Průměrný podíl amplitud membránového proudu na kladném a záporném potenciálu. Počet měření je uveden v závorce, hvězdičkou jsou označeny statisticky významně odlišné hodnoty od divokého typu.



Obrázek č. 17: Míra potenciace divokého typu a mutantních konstruktů 2mM Ca²⁺ na +80 mV a -80 mV, stanovená jako podíl maximální proudové odpovědi v prostředí vápenatých iontů a maxima dosaženého aktivací 100μM CA. Počet měření je uveden v závorce. Hvězdičkou jsou označeny průměrné hodnoty, které se statisticky významně liší od WT.

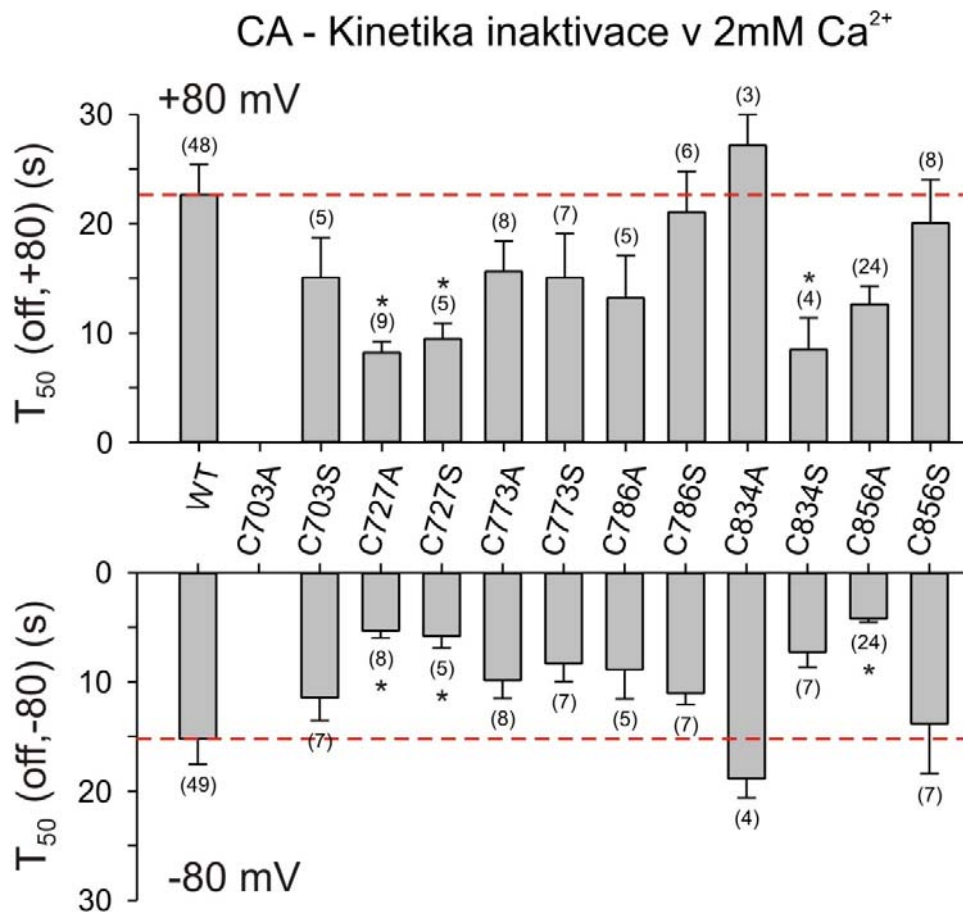
Míra potenciace tohoto mutantu významně převyšuje divoký typ TRPA1 ($2,0 \pm 0,2$ ($n = 8$) na +80 mV a $2,9 \pm 0,4$ na -80 mV). U konstruktů se substituovaným C856 došlo k signifikantnímu zvýšení potenciace na záporném membránovém potenciálu, nicméně proudy vyvolané 2mM Ca²⁺ byly oproti WT zhruba poloviční. V případě C856S došlo k výraznému opoždění maximální odpovědi vyvolané modulací Ca²⁺ ionty: $14,2 \pm 2,3$ s ($n = 7$) na +80 mV od počátku aplikace ECS-2Ca²⁺, což se projevilo „vlnou“ na průměrném záznamu chemického protokolu.

Inaktivace 2mM Ca²⁺

Inaktivace proudových odpovědí TRPA1 a mutantních konstruktů byla charakterizována parametrem $T_{50(off)}$, představujícím čas od maximální hodnoty potenciace, za který poklesne proudová odpověď na polovinu maximální hodnoty.

Průměrné hodnoty $T_{50}(off)$ na kladném a záporném membránovém potenciálu jsou uvedeny na obr. č. 18.

Statisticky významně rychlejší kinetika inaktivace byla pozorována u obou mutací cysteinu C727, které vykazovaly slabou potenciaci: C727A ($T_{50}(off) = 5,3 \pm 0,7$ s (n = 8) na -80 mV, $8,2 \pm 1,0$ s (n = 9) na +80 mV) a C727S ($T_{50}(off) = 5,8 \pm 1,1$ s (n = 5) na -80 mV, $9,5 \pm 1,4$ s (n = 5) na +80 mV). Rovněž u mutace C834S došlo k výraznému snížení hodnoty parametru $T_{50}(off)$ ($8,5 \pm 2,9$ s (n = 4) na +80 mV), které však na záporném membránovém potenciálu nebylo statisticky významné (P = 0,165). V případě mutace C856A dochází k vyšší míře zavírání kanálu na záporných potenciálech – pokles na polovinu maximální amplitudy při -80 mV trvá $4,2 \pm 0,3$ s (n = 24), což je v průměru přibližně třikrát méně než na +80 mV ($T_{50}(off) = 12,6 \pm 1,6$ s (n = 24)). Překvapivě substituce C856 za serin



Obrázek č. 18: Inaktivace WT a mutantních konstruktů vápenatými ionty po aplikaci 100 μ M skořicového aldehydu. Průměrné hodnoty $T_{50}(off)$ na membránovém potenciálu +80 mV a -80 mV. Počet měření je uveden v závorce. Hvězdička označuje signifikantně změněné hodnoty, vztahené vůči divokému typu (WT).

zachovala kinetické parametry inaktivace jako u divokého typu ($13,8 \pm 4,6$ s ($n=7$)) na -80 mV a $20,0 \pm 4,0$ s ($n=7$)), to samé platí i pro mutantní konstrukt C703S.

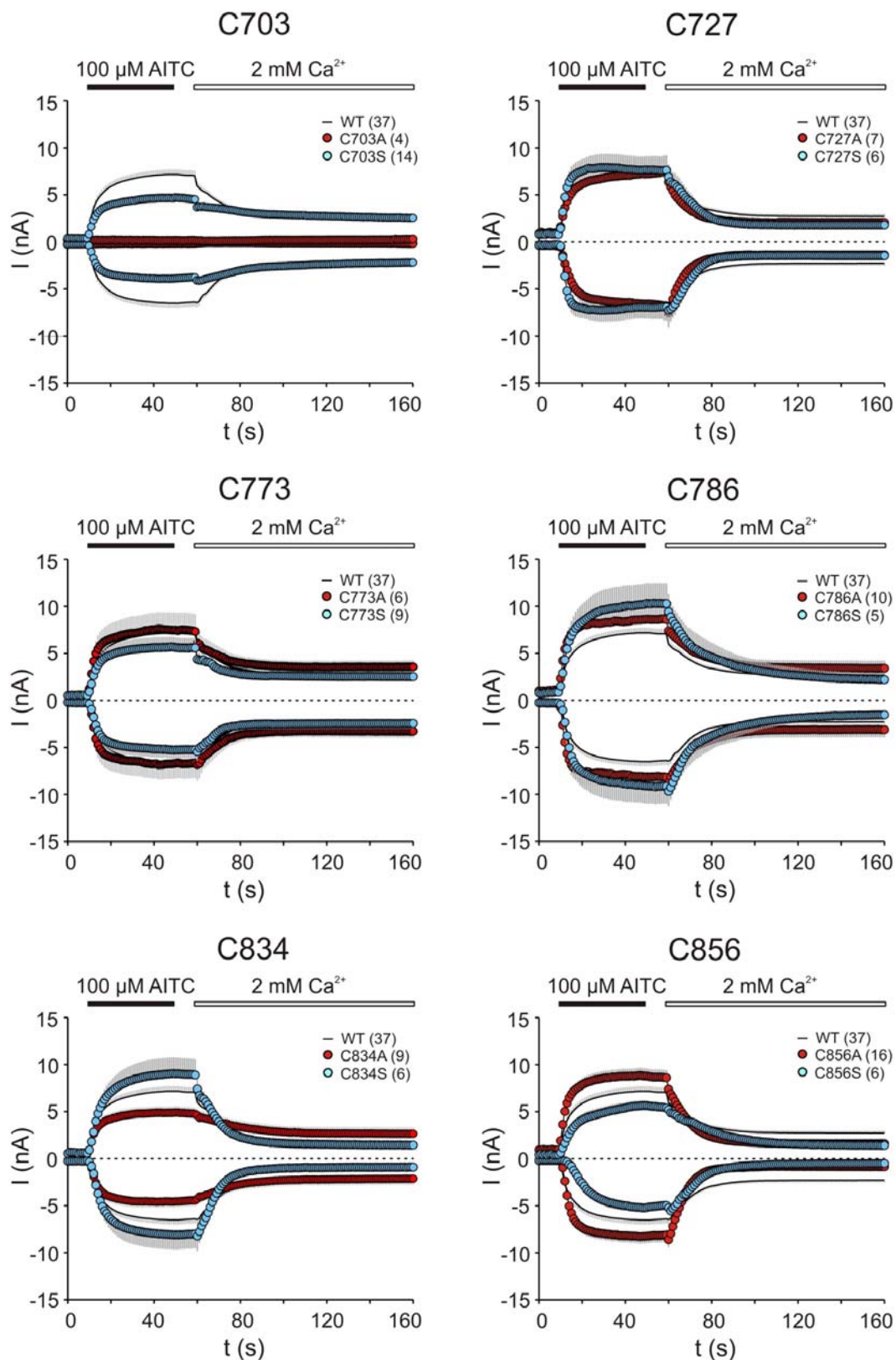
7.2.3 Chemická stimulace – allylisothiokyanát

V další sérii pokusů byl zkoumán vliv AITC, elektrofilního agonisty aktivujícího TRPA1 receptor skrze kovalentní modifikace. Časové průběhy proudových odpovědí mutantních konstruktů na experimentální podněty, zahrnující aplikaci roztoku $100\mu\text{M}$ AITC a modulaci vápenatými ionty o koncentraci 2mM , jsou uvedeny na obr. č. 19 na str. 54. Průměrné hodnoty maximální proudové odpovědi na AITC jsou uvedeny na obr. č. 20.A na str. 55.

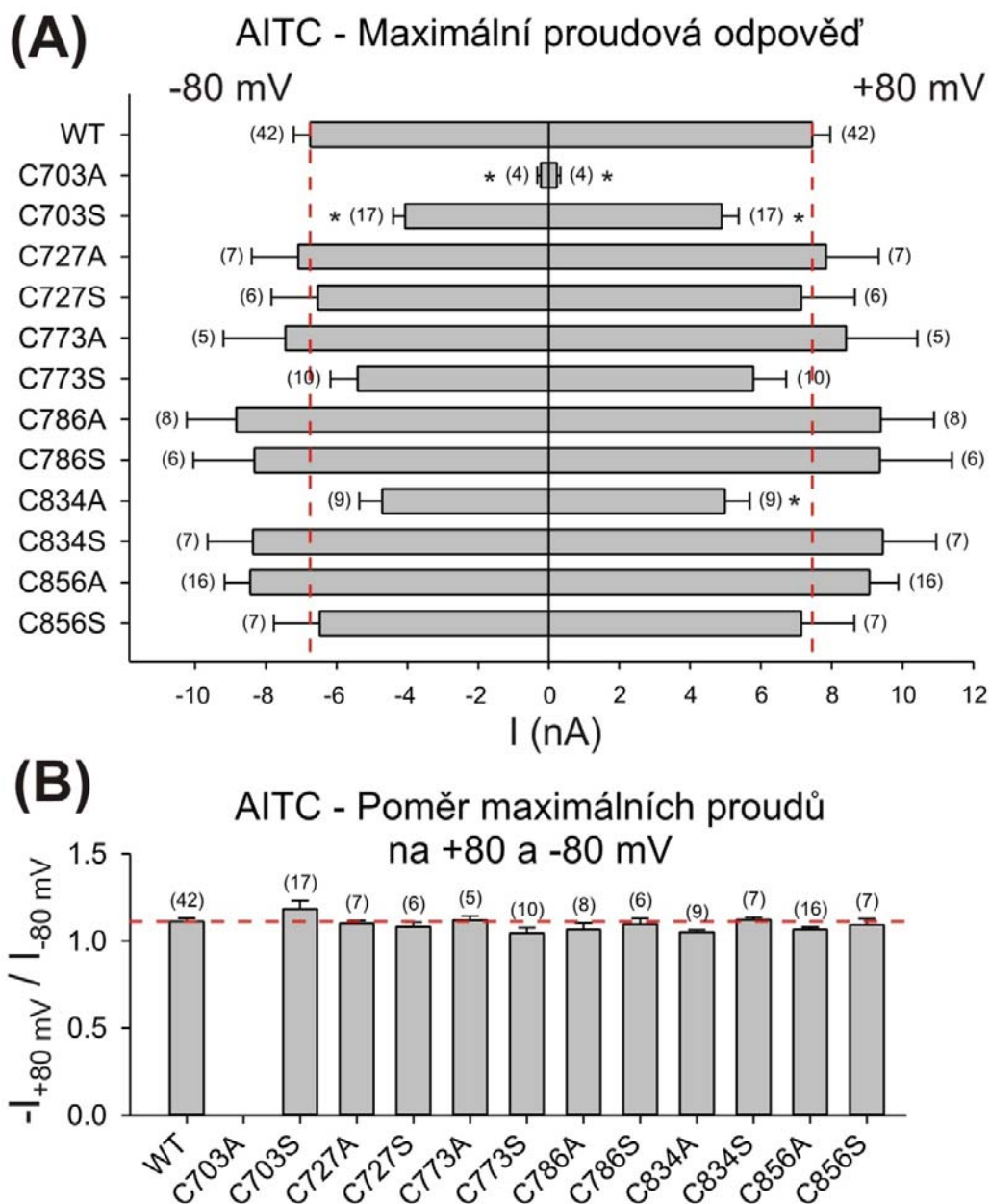
Aktivace $100\mu\text{M}$ AITC

Ani v přítomnosti silného aktivátoru o koncentraci převyšující stanovenou hodnotu EC_{50} pro divoký typ nevyvolala u mutace C703A viditelného zvýšení proudů, spojeného s otevíráním kanálů. V případě serinové mutace C703S, ačkoli bylo dosaženo v předchozích pokusech s CA srovnatelné aktivace s divokým typem TRPA1, aplikace AITC vyvolala výrazně sníženou proudovou odpověď ($4,9 \pm 0,5$ nA ($n=17$)) na $+80$ mV, $-4,1 \pm 0,3$ nA ($n=17$) na -80 mV). Snížení maximální odezvy na AITC bylo pozorováno také u mutace C834A ($5,0 \pm 0,7$ nA ($n=9$)) na $+80$ mV, $-4,7 \pm 0,6$ nA ($n=9$) na -80 mV), ačkoli rozdíl na záporném membránovém potenciálu nenabyl statistického významu ($P=0,058$). Naopak mutace C834S, C856A a obě mutace cysteinu C786 měly průměrně zvýšené membránové proudy, hladina významnosti rozdílu oproti WT však také neklesla pod zvolenou hodnotu $0,05$. Podíl membránových proudů na kladném a záporném potenciálu se u WT a všech mutantů blížil jedné (obr. č. 20.B na str. 55), což svědčí o plné aktivaci receptorů a ztrátě preference kladného membránového potenciálu při napěťové stimulaci.

Vzhledem k dostatečné aktivitě mutantních iontových kanálů a saturaci signálu na konci aplikace $100\mu\text{M}$ AITC se podařilo získat parametr $T_{50(on)}$ (obr. č. 21 nahoře na str. 56). Z časů vyplývá, že mutantní kanály C773S, C786S, C834A a C834S jsou aktivovány stejnou rychlostí jako divoký typ. U mutací C703S, C727S, C773A a C786A došlo k rychlejší aktivaci, přičemž statisticky významná odlišnost od WT vyšla

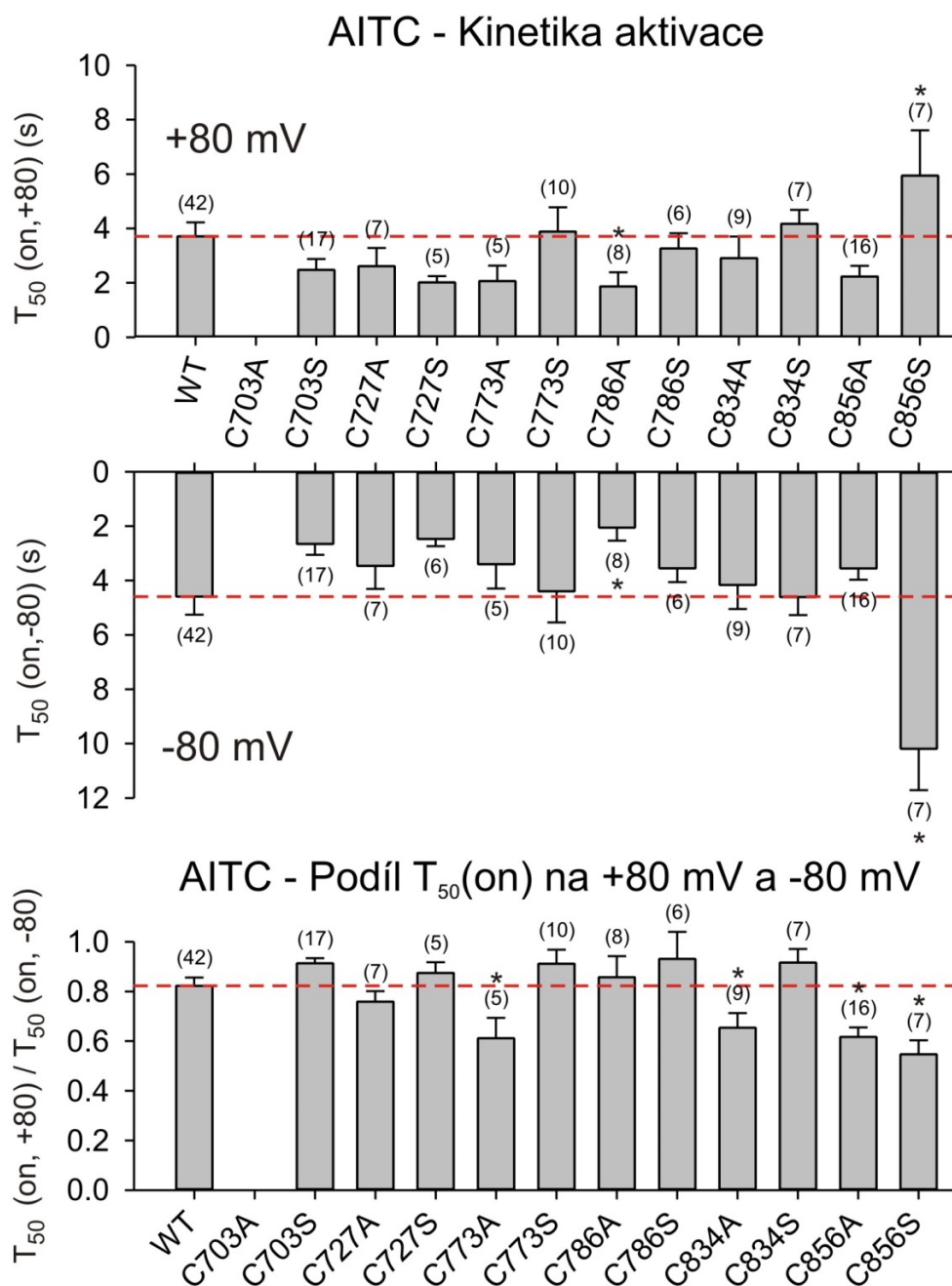


Obrázek č. 19: Průměrné odpovědi mutací transmembránových cysteinů TRPA1 receptoru na chemický protokol - stimulace allylisothiokyanátem (AITC). Pro srovnání divoký typ (WT, černá křivka).



Obrázek č. 20: (A) Průměrné hodnoty maximální amplitudy membránového proudu mutantních konstruktů na +80 a -80 mV, vyvolané aplikací 100 μM AITC. (B) Průměrný podíl membránových proudů na +80 a -80 mV, vyvolaných aplikací AITC. Počet měření je uveden v závorce. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významně rozdílné hodnoty oproti divokému typu (WT).

pouze pro mutaci C786A: ($2,1 \pm 0,5$ s ($n = -8$) na -80 mV a $1,9 \pm 0,5$ s ($n = 8$) na +80 mV). Ačkoliv konstrukt C856A vykazoval také mírné snížení času k dosažení poloviny maximální odezvy vůči AITC, u mutace C856S vyšel parametr $T_{50(on)}$ oproti WT výrazně vyšší ($10,2 \pm 1,5$ s ($n = 7$) na -80 mV a $5,9 \pm 1,7$ na +80 mV). Výraznější rozdíl v rychlosti na záporném membránovém potenciálu oproti hodnotám na +80 mV byl patrný u mutací C773A, C834A a obou mutací C856 (obr. č. 21 dole na str. 56).

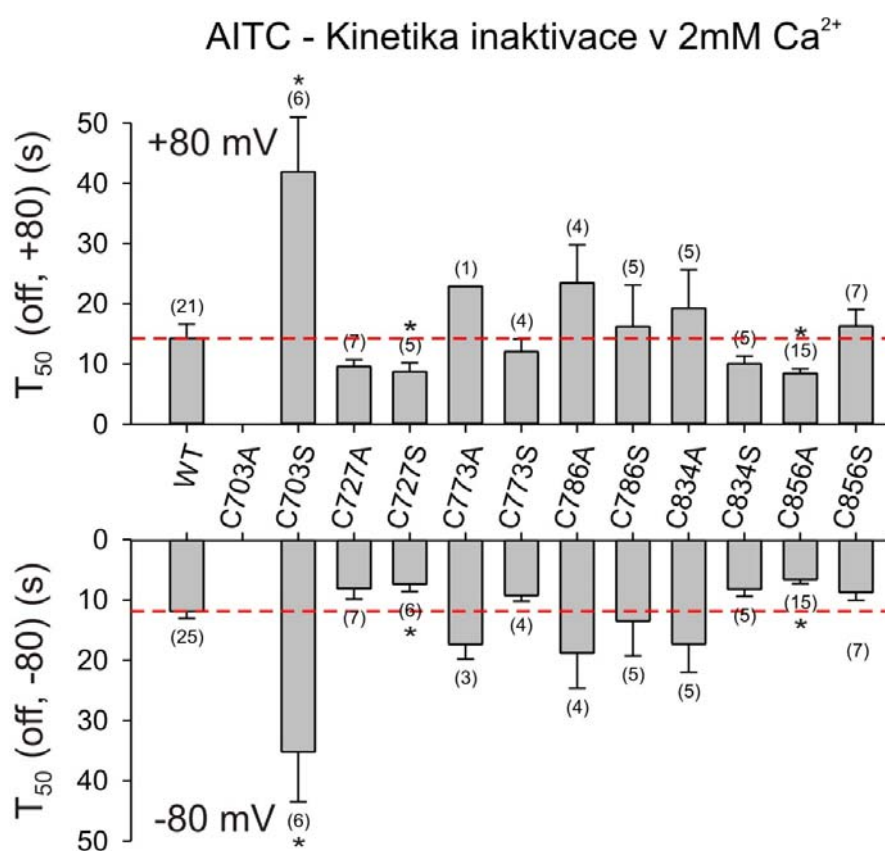


Obrázek č. 21: *Nahoře* - Kinetika aktivace mutantních konstruktů 100 μ M AITC. Průměrné časy T_{50} (on) na kladném a záporném membránovém potenciálu. *Dole* - Průměrný podíl časů T_{50} (on), stanovených na kladném záporném membránovém potenciálu. Počty měření jsou uvedena v závorce. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významně rozdílné hodnoty oproti divokému typu (WT).

Inaktivace 2mM Ca^{2+}

Podobně jako u divokého typu TRPA1 nebyla u mutantních kanálů pozorována potenciace v prostředí Ca^{2+} kationtů, namísto toho došlo k okamžité inaktivaci s pozvolným průběhem popsaným časovou konstantou T_{50} (off) (obr. č. 22 na str. 57).

Výrazným zpomalením inaktivace se projevila méně aktivovaná mutace C703S ($T_{50(off)} = 35,2 \pm 8,3$ s (n = 6) na -80 mV a $41,9 \pm 9,1$ s (n = 6) na +80 mV). Lehce pomalejší inaktivace byla pozorována i u konstruktů C786A a C834A, ovšem za hranicí statistické významnosti. Naopak mutantní kanály C727A, C727S, C834S a C856A spěly k inaktivaci rychleji, z toho statisticky významně C727S ($7,4 \pm 1,2$ s (n = 6) na -80 mV, $8,7 \pm 1,5$ s (n = 5) na +80 mV) a C856A ($6,6 \pm 0,7$ s (n = 15) na -80 mV, $8,4 \pm 0,8$ s (n = 15) na +80 mV). Rychlost inaktivace na kladném a záporném membránovém potenciálu byla u většiny mutantů vůči sobě ve stejném poměru jako u WT. Výjimku tvoří C856S, u které proběhla inaktivace na záporném potenciálu v průměru dvakrát rychleji.



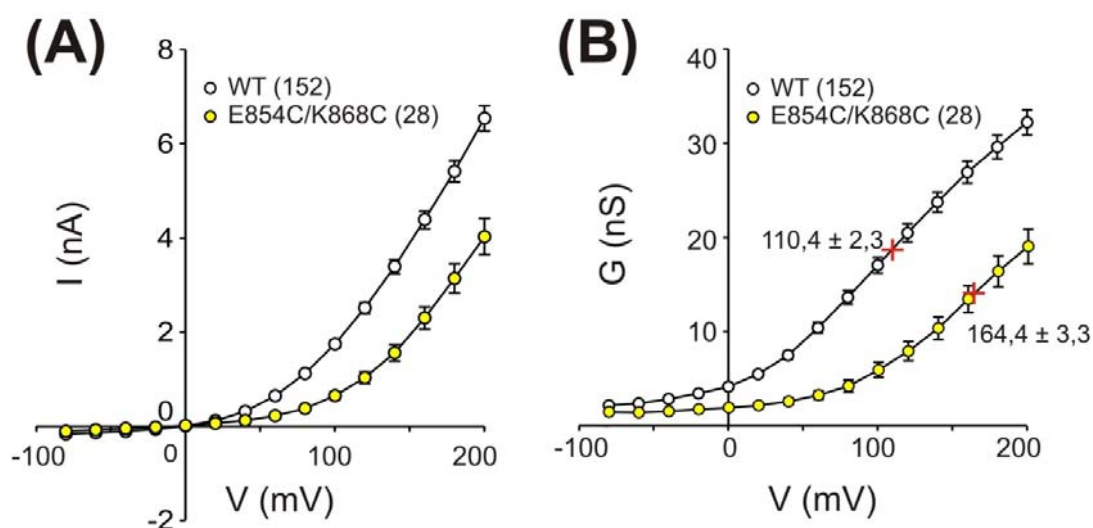
Obrázek č. 22: Inaktivace WT a mutantních konstruktů vápenatými ionty po aplikaci 100 μ M AITC. Průměrné hodnoty $T_{50(off)}$ na +80 a -80 mV membránovém potenciálu. Hvězdička označuje parametry signifikantně změněnými hodnotami vztahenými vůči divokému typu (WT).

7.3 Popis oblasti S4-S5 linkeru v transmembránové doméně – mutace E854C/K868C

Intracelulární klička mezi S4 a S5 transmembránovými segmenty spojuje senzoričnou doménu receptoru s centrální částí póru a představuje významné místo z hlediska vrátkování kanálu. Pomocí molekulárně dynamických simulací a cílenou mutagenézou byla dříve odhalena dvě rezidua – glutamát 854 a lysin 868 na S4-S5 – která spolu mohou potenciálně tvořit solný můstek [45]. Pro účely dalšího testování této hypotézy byla sestrojena dvojcysteinová mutace E854C/K868C.

Při aktivaci depolarizačním napětím dosahuje dvojcysteinový mutant viditelně nižších proudových odpovědí ($4,0 \pm 0,4$ nA ($n = 28$) na +200 mV) (obr. č. 23.A) a s nimi spojené vodivosti ($19,0 \pm 1,9$ nS ($n = 28$) na +200 mV) (obr. č. 23.B). Poloviční účinné napětí naznačuje výrazné narušení napěťové senzitivity ($V_{1/2} = 164,4 \pm 3,3$ mV ($n = 21$)).

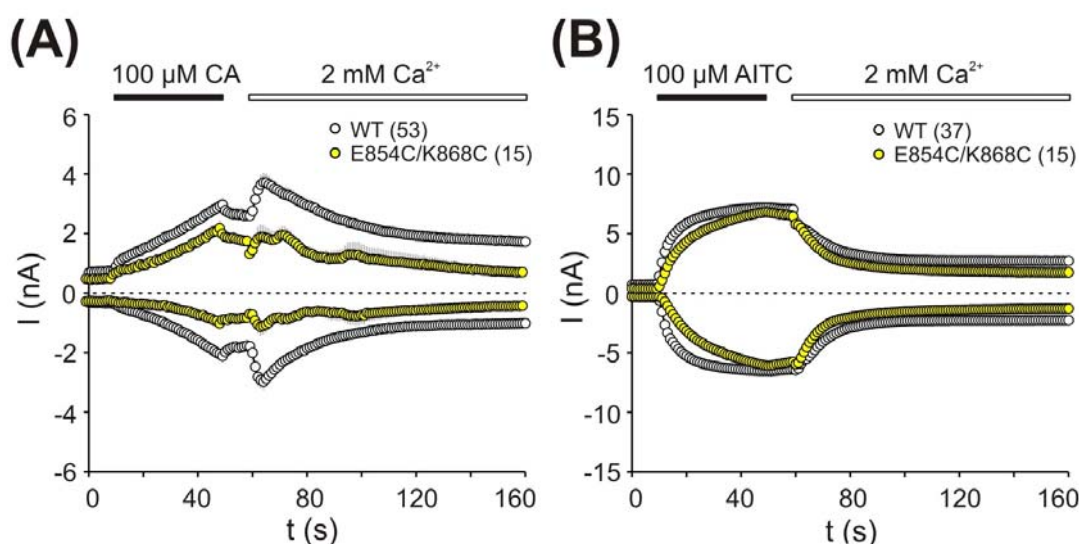
Také membránové proudy vyvolané aktivací 100 μ M CA ($2,2 \pm 0,3$ nA ($n = 15$) na +80 mV) nedosahovaly hodnot odpovídajících divokému typu a na záporném potenciálu byly více než dvojnásobně nižší: $-1,0 \pm 0,1$ nA ($n = 15$) (obr. č. 24.A na str. 59). Lehké prohnutí křivky „dovnitř“ naznačuje pomalejší kinetiku aktivace. V průměrné odpovědi mutantu není patrné výrazné maximum potenciace, ale několik malých „hrbolků“. Maximum potenciace 2mM Ca²⁺ totiž nastalo se značným



Obrázek č. 23: *I/V* charakteristika (A) a *G/V* charakteristika (B) divokého typu (WT, bíle) a dvojcysteinové mutace E854C/K868C (žlutě). Počty měření jsou uvedeny v závorce. Hodnoty polovičního účinného napětí v mV jsou označeny červeným křížkem.

zpožděním – v průměru za $16,0 \pm 3,5$ s ($n = 15$) na +80 mV. Následná inaktivace proběhla ve srovnání s WT rychleji na +80 mV ($T_{50(off)} = 9,7 \pm 2,1$ s ($n = 12$)), snížení parametru $T_{50(off)}$ na záporném potenciálu ($8,3 \pm 2,2$ s ($n = 10$) na -80 mV) však nebylo statisticky významné ($P = 0,065$).

Aktivací 100 μ M AITC dosáhly kanály dvojmutace E854C/K868C maximální proudové amplitudy podobné divokému typu ($6,8 \pm 0,6$ nA ($n = 15$) na +80 mV a $-6,1 \pm 0,5$ nA ($n = 15$) na -80 mV) (obr. č. 24.B). Minimální rozdíl obou amplitud proudu naznačuje dosažení stavu blízkého plnému otevření kanálu. Podobně jako při působení CA však aktivace probíhala prokazatelně pomaleji: na +80 mV je $T_{50(on)} = 7,1 \pm 1,1$ s ($n = 15$) a na -80 mV $10,8 \pm 1,7$ s ($n = 15$). Vlivem Ca^{2+} kationtů pak mutantní konstrukt přešel do fáze rychlé inaktivace popsané parametrem $T_{50(off)}$, který vyšel na +80 mV signifikantně odlišný od WT ($11,1 \pm 2,4$ s ($n = 13$)) a na -80 mV nenabyl statistického významu ($9,0 \pm 2,5$ s ($n = 13$)).



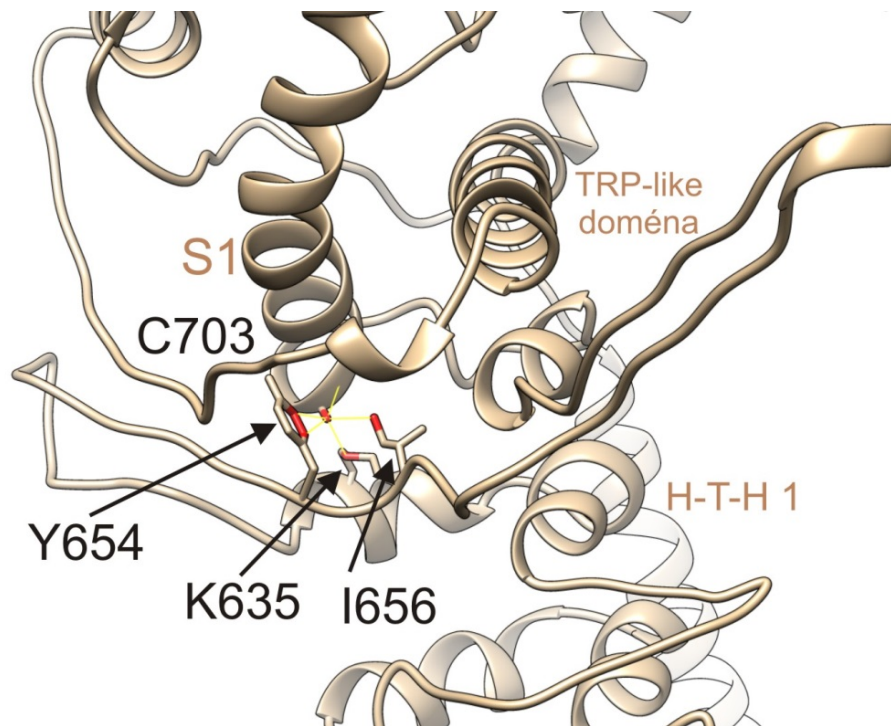
Obrázek č. 24: (A) Časový průběh chemického protokolu se 100 μ M koncentrací skořicového aldehydu (CA). (B) Časový průběh chemického protokolu se 100 μ M koncentrací allylisothiokyanátu (AITC). Počty měření jsou uvedeny v závorce.

8. Diskuse

Mezi hlavní aktivátory TRPA1 receptoru patří dráždivé látky elektrofilní povahy, jejichž detekce tímto receptorem byla pravděpodobně zprostředkovávána již před 500 miliony lety [37]. Dvě na sobě nezávislé skupiny prokázaly, že se tak děje kovalentní modifikací cysteinových a lysinových aminokyselinových zbytků C621, C641, C665 a K710, která jsou dobře dostupná z intracelulární strany [33, 38]. Výše uvedená reaktivní rezidua jsou lokalizována v cytoplasmatické části receptoru (tzv. „pre-S1“), která spojuje ankyrinovou doménu receptoru se strukturně rozlišenou šroubovicí (P701-Y714), bezprostředně přecházející v první transmembránový helix. Vysoká reaktivita cysteinů v pre-S1 oblasti může být vysvětlena jejich přístupnou pozicí a umístěním v části receptoru spojené s převodem aktivačních signálů na vrátkování kanálu. Práce Moparthy et al. [18] však dokazuje, že odstraněním N- konce mohou být pro aktivaci zpřístupněna i jiná reakční místa.

Cysteinová rezidua C727, C773, C786 a C834 v transmembránové oblasti, jejichž funkční úloha byla předmětem této diplomové práce, jsou orientována do prostředí lipidové dvojvrstvy a teoreticky mohou být dostupná pro lipofilní elektrofilní látky. Naproti tomu cysteiny C703 a C856 se nacházejí v oblastech, které nejsou snadno dostupné pro elektrofilní látky procházející membránou, a jejich přímou interakci s těmito látkami jsme neočekávali. Naše výsledky ukazují, že ani jedno z cysteinových reziduí v transmembránové oblasti zřejmě přímo nereaguje s allylisothiokyanátem nebo skořicovým aldehydem. Tato rezidua mají specifickou strukturní úlohu a jednotlivé mutace všech šesti cysteinových reziduí způsobily změny v nejméně jednom ze sledovaných parametrů aktivace TRPA1 iontového kanálu.

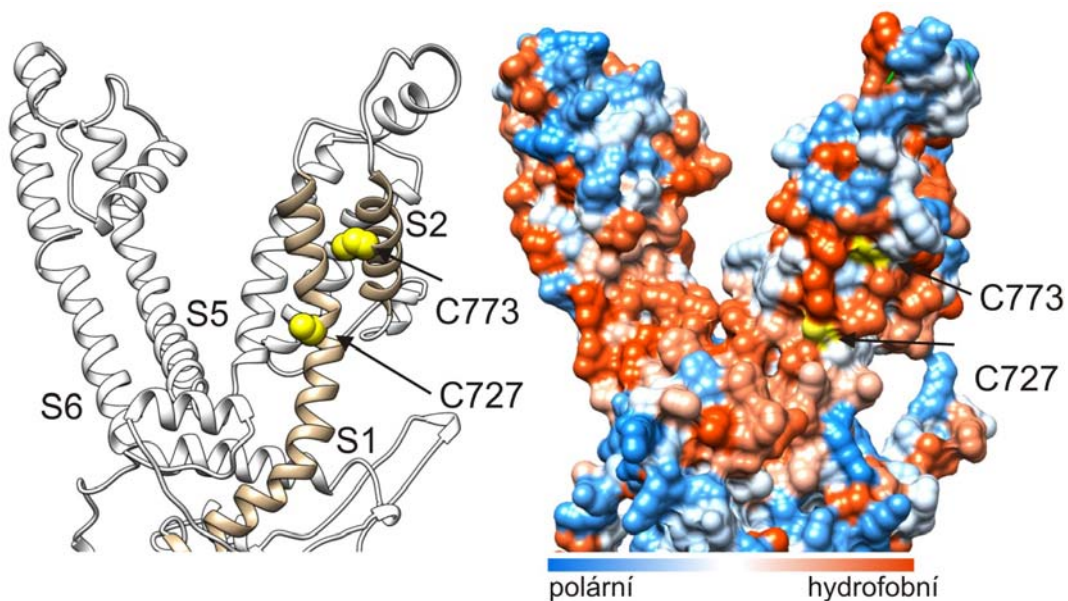
Překvapivé bylo naše zjištění, že záměna cysteinu za jiné malé reziduum může dramatickým způsobem pozměnit charakteristiku napět'ové aktivace TRPA1 kanálu. Za jeden z nejvýznamnějších výsledků této části naší studie považujeme pozorování, že mutace C703S snížila o více než dvě třetiny proudové odpovědi vyvolané depolarizačním napětím, zatímco membránové proudy vyvolané skořicovým aldehydem se nelišily od divokého typu receptoru. Toto reziduum je orientováno do cytoplasmatické oblasti proteinu a interaguje s prvním H-T-H motivem (K635) a prvním β -vlákem (Y654 a I656) v pre-S1 oblasti (obr. č. 25 na str. 61). Náhrada C703 za alanin vedla k nefunkčnímu konstrukt, je tedy pravděpodobné, že polární reziduum



Obrázek č. 25: Cysteinové reziduum C703 je orientováno do vnitřní oblasti proteinu a interaguje s prvním H-T-H motivem (K635) a s prvním ze dvou antiparalelních β -vláken (Y654 a I656) v pre-S1 oblasti.

na této pozici je nezbytné pro vytvoření interakcí, které jsou důležité pro napětově-závislé vrátkování kanálu. Aktivace TRPA1 kanálu skořicovým aldehydem snížila vliv rezidua na pozici 703 na energetickou rovnováhu vrátkovacího mechanismu. Je přitom zajímavé, že na rozdíl od skořicového aldehydu se v přítomnosti AITC toto místo funkčně uplatňuje, protože odpovědi C703S byly signifikantně nižší na kladných i záporných membránových potenciálech a nepodléhaly inaktivaci po aplikaci 2mM koncentrace vápenatých iontů v extracelulárním roztoku. Tento výsledek naznačuje, že konformační změny vyvolané skořicovým aldehydem mohou být zprostředkovány odlišnými doménami receptoru, než kterými je zajištěna „základní“ energetická rovnováha vrátkovacího mechanismu.

Záměna cysteinu C727 za alanin nebo serin neovlivnila odpovědi vyvolané depolarizačním napětím, u obou mutantních konstruktů však byl v případě aktivace CA signifikantně zvýšen inaktivační účinek extracelulárních vápenatých iontů. Mutace C727S vykazovala rychlejší průběh inaktivace i u reaktivnějšího AITC. Toto reziduum je součástí hydrofobní struktury exponované prostředí lipidové dvojvrstvy a externí aplikace vápenatých iontů na ně přímo nepůsobí (obr. č. 26 na str. 62). Cystein se nachází uprostřed S1 helikálního segmentu, přičemž je natočen směrem od protilehlého



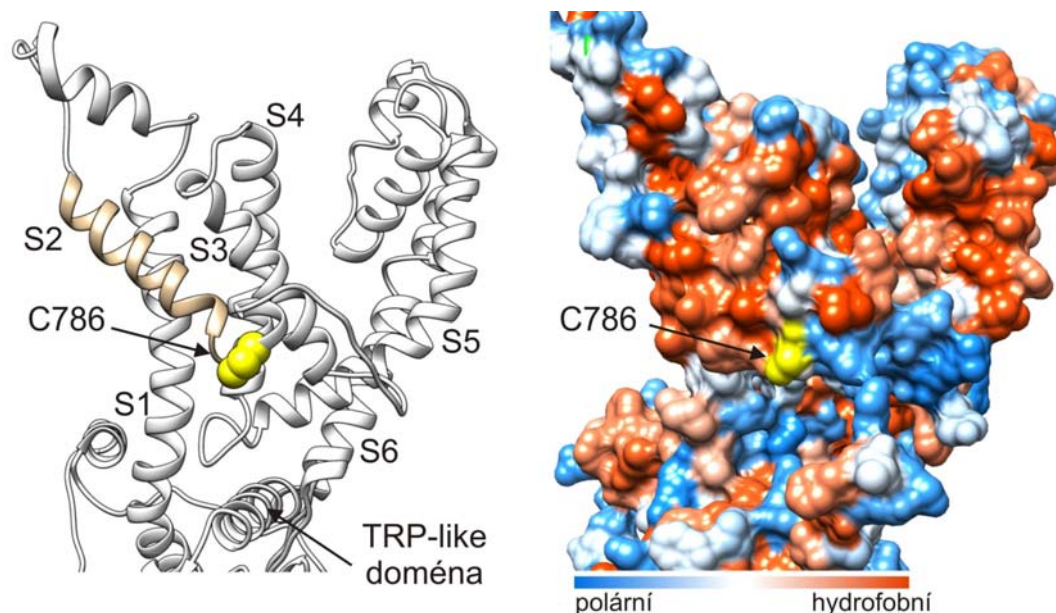
Obrázek č. 26: Cysteinová rezidua C727 a C773 v transmembránových helixech S1 a S2 jsou součástí stejné hydrofobní „kapsy“, která je orientována směrem k lipidové dvojvrstvě membrány.

S4 helixu. Oproti tomu sousední vysoce konzervovaný tyrosin Y726 tvoří π - π interakce hned se třemi aromatickými rezidui S4 helixu (Y842, F846, Y849), které mohou po relativně malém posunu dále interagovat až s aromáty na S5 segmentu sousední podjednotky. Orientace C727 a výrazná stabilizace celého S1 segmentu vysvětluje nepatrný dopad zvolených mutací na aktivaci TRPA1 receptoru. Skutečnost, že záměna za serin i alanin má podobný účinek spíše naznačuje, že C727 je součástí převodního mechanismu, který napomáhá aktivaci receptoru v přítomnosti vápenatých iontů (snižuje míru inaktivace).

Cysteinový zbytek C773 je součástí stejné hydrofobní „kapsy“ jako C727 (obr. č. 26), Oproti C727 byla v důsledku mutace cysteinového rezidua C773 snížená citlivost receptoru k depolarizaci, což může být vysvětleno lokalizací C773 blíže k horní lipidové vrstvě buněčné membrány. Substituce C773S si zachovala polaritu a ve výsledku byla pro aplikaci depolarizačním napětím příznivější. Nižší mírou potenciace společně se zvýšenou rychlostí inaktivace (ačkoli ne významně) se serinová mutace viditelně podobala mutacím rezidua C727. Naopak C773A dosáhlo plné potenciace i přes lehce sníženou CA proudovou odpověď. Možným zdůvodněním snížení proudů během aplikace CA může být vliv orientace rezidua směrem k hydrofobním zbytkům sousední S1 podjednotky (L735, I736, P732). Během plné aktivace kanálů 100 μ M AITC se však chovaly obě mutace jako divoký typ TRPA1.

Z hlediska chemické aktivace se jako nejméně významným ukázalo reziduum C786, jehož mutace za alanin nebo za serin nevedly k žádným významným poruchám v účinnosti agonistů. Mutace za alanin však zvýšila proudy vyvolané depolarizačním napětím bez přítomnosti agonisty, zatímco serin napětíovou citlivost kanálu snížil. Také aktivace roztokem AITC proběhla rychleji u mutace za alanin. V kontextu primární sekvence je tento méně konzervovaný cystein těsně následován zcela konzervovaným motivem ⁷⁸⁷KEXXQXXQ⁷⁹⁵, který je pro funkci kanálu zřejmě více důležitý. C786 leží těsně pod plasmatickou membránou na flexibilní intracelulární kličce, která je součástí prostorného, solvatovatelného polárního vestibulu (obr. č. 27). Změna v symetrii vnější a vnitřní solvatace senzoru byla v nedávné době navržena jako jeden z možných obecných mechanismů napětíové aktivace TRP iontových kanálů [2].

Cystein C834 připomíná umístěním C773 – nachází se v horní části S4 segmentu a směřuje k polárnímu threoninu T814 na protější S3 helixu. Vliv tohoto rezidua se pravděpodobně (podobně jako u C703S) uplatňuje více, když je TRPA1 kanál zavřený, nebo plně aktivovaný: při aplikaci skořicového aldehydu, který kanál aktivuje jen částečně, jsou odpovědi konstruktů C834A/S na obou membránových potenciálech plně srovnatelné s divokým typem, avšak v saturující koncentraci AITC jsou odpovědi C834A nižší než u TRPA1. Citlivost vůči depolarizačnímu napětí je obdobně jakou u mutací C773 snížena, ovšem ne tak výrazně. Substitutece za serin ovlivnila míru

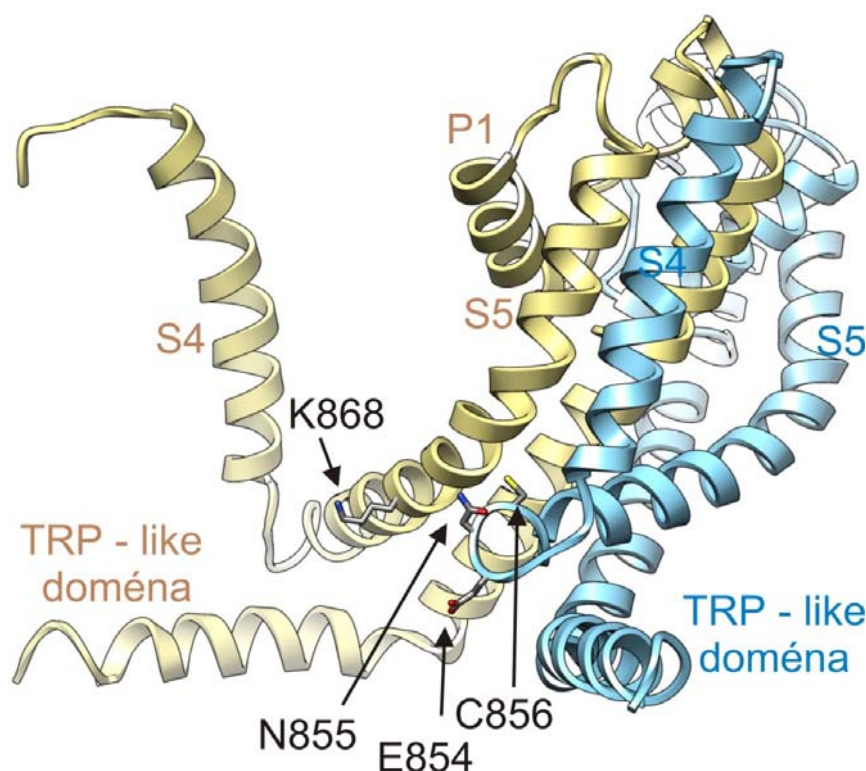


Obrázek č. 27: Cysteinové reziduum C786 v intracelulární oblasti spojující transmembránové helixy S2 a S3 je na povrchu receptoru orientovaném do prostředí vnitřní strany membrány v místech zřetelného rozhraní mezi hydrofobní a polární částí.

potenciace a rychlost inaktivace v prostředí Ca^{2+} iontů, což naznačuje roli C834 a jeho blízkého okolí v převodu inaktivačního účinku vápenatých iontů.

Poslední studovaný transmembránový cystein se nachází v oblasti spojující transmembránové helixy S4 a S5 (obr. č. 28). Tato velmi důležitá část receptoru byla nedávno funkčně popsána [42, 45], a to zejména v souvislosti s mutací N855S, jež je ve formě polymorfismu příčinou změn nocicepční reakce u člověka [42]. ve strukturně-funkční studii kolegové z naší laboratoře v roce 2015 prokázali, že příčinou zvýšené aktivity mutantu N855S lidského TRPA1 receptoru na negativních membránových potenciálech může být porucha v interakci mezi dvěma sousedními podjednotkami receptoru. Záměnou nábojů záporně a kladně nabitých reziduí E854 a K868 bylo prokázáno, že tato rezidua mohou být za určitých podmínek ve vzájemné blízkosti a jejich interakce prostřednictvím solných můstků může výrazně přispívat k energetické bilanci vrátkovacího mechanismu kanálu [45].

Serinová mutace C856S již byla dříve popsána metodou *calcium imaging* jako necitlivá vůči hyperoxii [61]. Naše výsledky jsou v souladu s tímto tvrzením, ovšem jen při aplikovaném membránovém potenciálu -80 mV, na kterém je použita metoda



Obrázek č. 28: Cysteinové reziduum C856 se nachází ve vnitřní oblasti spojující transmembránové helixy S4 a S5 v blízkosti funkčně důležitých reziduí N855, E854 a K868. Ukázány jsou jen S4-S6 oblasti dvou sousedních podjednotek označených žlutou a modrou barvou.

prováděna. Překvapením bylo zjištění, že ačkoliv serinová a alaninová mutace vykazovala výrazné snížení až blokádu proudové odpovědi na záporném napětí, na kladném potenciálu dosahovaly oba konstrukty stejných hodnot jako divoký typ. Výrazná dysfunkce obou konstruktů na záporných membránových potenciálech se projevila také během aplikace agonistů - při aktivaci skořicovým aldehydem byly membránové proudy na záporných potenciálech téměř 5-krát nižší než na kladných potenciálech (obr. č. 16 na str. 50). V menší míře se tato „napěťová asymetrie“ projevila i v případě kinetiky aktivace AITC, ale jen u C856S, nikoliv u C856A (obr. č. 21 na str. 56). Dosud nemáme k dispozici strukturu aktivovaného (otevřeného) TRPA1 kanálu a bez dalších experimentů není možné jednoznačně rozhodnout o molekulární podstatě této pozorované změny napěťové závislosti. U ptačích orthologů TRPA1 je několik reziduí S4-S5 linkeru včetně C856 nahrazeno aromatickými aminokyselinami, což by v rámci hTRPA1 zesílilo řadu již existujících patrových π - π interakcí a funkčně by propojilo S1 a S5 segmenty. Dalším vysvětlením může být narušení solvatace napěťového senzoru. V oblasti solvatovatelného vestibulu byly naší laboratoří popsány dva mutantní konstrukty (K787A, H719A), vykazující podobný napěťový charakter jako mutace rezidua C856 (viz příloha, publikace v přípravě). Histidin H719 interaguje s aromatickým kruhem rezidua fenylalaninu F853 v blízkosti cysteinu C856, je tedy možné, že mutací se zprostředkovaně poškodí funkce H719, nebo jiného významného rezidua na S4-S5 linkeru (N855, E854).

S touto hypotézou souvisí i hledání možných důkazů strukturní blízkosti E854 a K868, potenciálně stabilizujících sousední podjednotky. Neutralizace nebo záměna náboje jednoho z vazebných partnerů vedla k výraznému poškození aktivace TRPA1 receptoru depolarizačním napětím a AITC. Záměna náboje obou reziduí (E854R/K868E) výrazně nepomohla z hlediska aktivace depolarizačním napětím, významnou měrou však obnovila funkci kanálu při stimulaci 100 μ M AITC [45]. V publikované struktuře jsou tato rezidua vzdálena přibližně 15 Å, jedná se však o strukturu zavřeného kanálu. Není zřejmé, zda se při aktivaci podjednotky mohou k sobě přiblížit na vzdálenost zvyšující pravděpodobnost interakce. Jedním z cílů této diplomové práce bylo pokusit se tuto záležitost objasnit tím, že dvojice reziduí E854 a K868 byla substituována cysteiny, které by se při některé konformaci kanálu k sobě mohly přiblížit a modulovat aktivitu kanálu vytvořením disulfidických můstků.

Naše výsledky ukazují, že vlastnosti konstruktu E854C/K868C jsou velice podobné výše zmíněné mutaci se zaměněnými náboji. Dvojcyteinová mutace vykazovala výrazně sníženou citlivost k depolarizačnímu napětí, i přesto však byla funkce kanálu coby napěťového senzoru zachována. Narušení napěťové citlivosti se odrazilo také při chemické stimulaci CA, která zřejmě odráží zásadní poruchu ve vrátkování kanálu. Je pravděpodobné, že přiblížení cysteinových reziduí zvyšuje energetickou náročnost otevření pomocí vnitřního vrátkovacího mechanismu, o čemž svědčí i pomalejší kinetika CA i AITC odpovědi (obr. č. 24.B na str. 59). Narušená kinetika aktivace byla mnohem výraznější u dvojmutace E854R/K868E a mutací samotného rezidua E854, ne však v případě substitucí lysinu 868. Je tedy možné, že se glutamát 854 podílí na správném a rychlém převodu strukturních změn, vyvolaných aplikací elektrofilních činidel, na vrátkovacím mechanismu kanálu. Maximální dosažená hodnota membránových proudů vyvolaných AITC se podobně jako u E854R/K868E neliší od divokého typu receptoru, což znamená, že funkční exprese konstruktů na membráně je plně zachována.

U obou dvojmutací E854R/K868E a E854C/K868C je zachována schopnost stabilizace struktury kanálu interakcí postranních řetězců na substituovaných místech, což potvrzuje jejich blízkost. Energie disulfidické vazby je ve srovnání se solným můstkem řádově vyšší, což by vysvětlovalo menší narušení kinetiky aktivace dvojcyteinové mutace a zachovalou napěťovou závislost. Stálost disulfidického můstku je však nejasná - nedošlo k zablokování kanálu v jedné konformaci. Dvojcyteinová mutace poskytla proudové odpovědi v celé délce chemického protokolu, výrazně opožděný nástup potenciace lze přičíst menšímu vtoku Ca^{2+} iontů kvůli nízké aktivitě receptoru. Nelze tedy jednoznačně určit, ve které konformaci došlo ke vzniku disulfidické vazby. Poměrně velká vzdálenost obou reziduí také nabízí možnost, že se u jednotlivých kanálů nerealizovaly všechny čtyři disulfidické vazby. V redukčním prostředí buňky navíc může docházet k redukci disulfidické vazby za vzniku dvou thiolových skupin. K dodatečnému ověření, zda ke snížené citlivosti vůči aktivačním podnětům dochází právě v důsledku tvorby disulfidických můstků, by dopomohlo měření metodou *patch-clamp* v konfiguraci „*inside-out*“ a aplikací redukčního činidla (např. glutathion) v průběhu experimentu.

Kromě hlavního cíle charakteristiky mutantních konstruktů elektrofyziologickými metodami se nám podařilo zaznamenat vliv osmolality aplikovaných roztoků

na aktivitu divokého typu TRPA1 receptoru. Aktivace TRPA1 hypertonickým roztokem (+30 mmol·dm⁻³) byla již dříve popsána v literatuře [11], příčina výrazného posunu reverzního potenciálu však vysvětlena nebyla. Naše výsledky ukazují, že změny osmolality v přítomnosti agonisty (AITC o koncentraci 100 μM), zejména po přidání vápenatých iontů, mohou výrazně pozměnit relativní propustnost iontů časově závislým způsobem. Tato pozorování jsou zajímavým tématem pro příští experimenty a jejich vysvětlení by mohlo být nejen klíčem k pochopení (zatím nevyjasněných) mechanismů Ca²⁺-závislé inaktivace, ale mohlo by vést k vysvětlení dějů souvisejících s dilatací póru TRPA1 iontového kanálu.

9. Závěr

Pomocí elektrofyziologických a molekulárně biologických technik jsme:

- (1) charakterizovali funkční úlohu všech cysteinových reziduí v transmembránové oblasti lidského TRPA1 receptoru. Ukázali jsme, že mutace cysteinových reziduí pozmění funkční charakteristiky vždy v nejméně jednom ze sledovaných parametrů.
- (2) Zjistili jsme, že žádné ze studovaných cysteinových reziduí se neúčastní aktivace elektrofilními látkami přímo. Mutace cysteinů C703, C773, C834 a C856 výrazně ovlivňují citlivost TRPA1 receptoru k depolarizačnímu napětí, což znamená, že tyto cysteiny mají důležitou strukturní úlohu ve vrátkovacím mechanismu TRPA1 kanálu. Cysteiny C727 a C773 napomáhají aktivaci receptoru v přítomnosti Ca^{2+} iontů.
- (3) Získané informace o funkci jednotlivých cysteinů jsme zasadili do strukturně-funkčního kontextu. Cysteiny C856 a C703 se nacházejí v oblastech důležitých pro převod aktivačního stimulu na vrátkování kanálu, kde se specifickým způsobem podílí na transdukci depolarizačního napětí.
- (4) Pomocí záměny dvojice vybraných reziduí ve 4. a 5. transmembránové doméně za cysteinové zbytky jsme ověřili sterickou blízkost mezi TRPA1 podjednotkami. Stav, ve kterém došlo ke vzniku disulfidického můstku, se určit nepodařilo.
- (5) Ukázali jsme, že relativně konzervativní záměna na pozici C703 selektivně ovlivnila citlivost TRPA1 k depolarizačnímu napětí. Předložili jsme hypotézu, že napěťově závislé vrátkování kanálu je strukturně určeno pre-S1 oblastí receptoru, jejíž energetický příspěvek se snižuje po aktivaci elektrofilním agonistou.

10. Použitá literatura

1. Nilius, B., Appendino, G., Owsianik, G.: *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)* 464, 425-458 (2012)
2. Palovcak, E., Delemotte, L., Klein, M.L., Carnevale, V.: *The Journal of general physiology* 146, 37-50 (2015)
3. Wang, Y.Y., Chang, R.B., Waters, H.N., McKemy, D.D., Liman, E.R.: *The Journal of Biological Chemistry* 283, 32691-32703 (2008)
4. Peng, G., Shi, X., Kadowaki, T.: *Molecular Phylogenetics and Evolution* 84, 145-157 (2015)
5. Jaquemar, D., Schenker, T., Trueb, B.: *The Journal of Biological Chemistry* 274, 7325-7333 (1999)
6. Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A.: *Neuron* 41, 849-857 (2004)
7. Atoyan, R., Shander, D., Botchkareva, N.V.: *The Journal of Investigative Dermatology* 129, 2312-2315 (2009)
8. Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A.: *Cell* 112, 819-829 (2003)
9. Saito, S., Nakatsuka, K., Takahashi, K., Fukuta, N., Imagawa, T., Ohta, T., Tominaga, M.: *The Journal of Biological Chemistry* 287, 30743-30754 (2012)
10. Kwan, K.Y., Glazer, J.M., Corey, D.P., Rice, F.L., Stucky, C.L.: *The Journal of Neuroscience* 29, 4808-4819 (2009)
11. Zhang, X.F., Chen, J., Faltynek, C.R., Moreland, R.B., Neelands, T.R.: *The European Journal of Neuroscience* 27, 605-611 (2008)
12. de la Roche, J., Eberhardt, M.J., Klinger, A.B., Stanslowsky, N., Wegner, F., Koppert, W., Reeh, P.W., Lampert, A., Fischer, M.J., Leffler, A.: *The Journal of Biological Chemistry* 288, 20280-20292 (2013)
13. Hu, H., Bandell, M., Petrus, M.J., Zhu, M.X., Patapoutian, A.: *Nature Chemical Biology* 5, 183-190 (2009)
14. Nagatomo, K., Ishii, H., Yamamoto, T., Nakajo, K., Kubo, Y.: *Biophysical Journal* 99, 3609-3618 (2010)
15. Laursen, W.J., Bagriantsev, S.N., Gracheva, E.O.: *Current Topics in Membranes* 74, 89-112 (2014)
16. Hinman, A., Chuang, H.H., Bautista, D.M., Julius, D.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19564-19568 (2006)
17. Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., Patapoutian, A.: *Nature* 445, 541-545 (2007)
18. Moparthy, L., Survery, S., Kreir, M., Simonsen, C., Kjellbom, P., Hogestatt, E.D., Johanson, U., Zygmunt, P.M.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 16901-16906 (2014)
19. Andrade, E.L., Meotti, F.C., Calixto, J.B.: *Pharmacology and Therapeutics* 133, 189-204 (2012)
20. <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>, (přístup 21:44, 15.4. 2016)
21. Basbaum, A.I., Jessell, T.: *Pain*, v knize *Principles of Neural Science*, (Kandel, E.R., Schwartz, J. H., Jessell, T. T., Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J., ed.) The Mc Graw Hill Medical, New York, str. 530-555. (2013)

22. Dai, Y.: *Seminars in Immunopathology* (2015)
23. Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D.: *Cell* 139, 267-284 (2009)
24. Basbaum, A.I., Woolf, C.J.: *Current Biology* 9, R429-431 (1999)
25. Bautista, D.M., Pellegrino, M., Tsunozaki, M.: *Annual Review of Physiology* 75, 181-200 (2013)
26. Nassini, R., Gees, M., Harrison, S., De Siena, G., Materazzi, S., Moretto, N., Failli, P., Preti, D., Marchetti, N., Cavazzini, A., Mancini, F., Pedretti, P., Nilius, B., Patacchini, R., Geppetti, P.: *Pain* 152, 1621-1631 (2011)
27. Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M., Noguchi, K.: *The Journal of Clinical Investigation* 115, 2393-2401 (2005)
28. Tatsumi, E., Katsura, H., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tsuzuki, K., Noguchi, K., Sakagami, M.: *NeuroReport* 26, 856-861 (2015)
29. Fukuoka, T., Noguchi, K.: *Molecular Neurobiology* 26, 57-67 (2002)
30. Cvetkov, T.L., Huynh, K.W., Cohen, M.R., Moiseenkova-Bell, V.Y.: *The Journal of Biological Chemistry* 286, 38168-38176 (2011)
31. Sadofsky, L.R., Sreekrishna, K.T., Lin, Y., Schinaman, R., Gorka, K., Mantri, Y., Haight, J.C., Huggins, T.G., Isfort, R.J., Bascom, C.C., Morice, A.H.: *Cells* 3, 616-626 (2014)
32. Brewster, M.S., Gaudet, R.: *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 37, 1184-1192 (2015)
33. Paulsen, C.E., Armache, J.P., Gao, Y., Cheng, Y., Julius, D.: *Nature* 525, 552 (2015)
34. Sotomayor, M., Corey, D.P., Schulten, K.: *Structure* 13, 669-682 (2005)
35. Gaudet, R.: *Mol Biosyst* 4, 372-379 (2008)
36. Nilius, B., Prenen, J., Owsianik, G.: *Journal of Physiology* 589, 1543-1549 (2011)
37. Kang, K., Pulver, S.R., Panzano, V.C., Chang, E.C., Griffith, L.C., Theobald, D.L., Garrity, P.A.: *Nature* 464, 597-600 (2010)
38. Wang, L., Cvetkov, T.L., Chance, M.R., Moiseenkova-Bell, V.Y.: *The Journal of Biological Chemistry* 287, 6169-6176 (2012)
39. Cordero-Morales, J.F., Gracheva, E.O., Julius, D.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E1184-1191 (2011)
40. Doerner, J.F., Gisselmann, G., Hatt, H., Wetzel, C.H.: *The Journal of Biological Chemistry* 282, 13180-13189 (2007)
41. Karashima, Y., Prenen, J., Talavera, K., Janssens, A., Voets, T., Nilius, B.: *Biophysical Journal* 98, 773-783 (2010)
42. Kremeyer, B., Lopera, F., Cox, J.J., Momin, A., Rugiero, F., Marsh, S., Woods, C.G., Jones, N.G., Paterson, K.J., Fricker, F.R., Villegas, A., Acosta, N., Pineda-Trujillo, N.G., Ramirez, J.D., Zea, J., Burley, M.W., Bedoya, G., Bennett, D.L., Wood, J.N., Ruiz-Linares, A.: *Neuron* 66, 671-680 (2010)
43. Boukalova, S., Touska, F., Marsakova, L., Hynkova, A., Sura, L., Chvojka, S., Dittert, I., Vlachova, V.: *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 63 Suppl 1, S205-213 (2014)
44. Zayats, V., Samad, A., Minofar, B., Roelofs, K.E., Stockner, T., Ettrich, R.: *Journal of Molecular Modeling* 19, 4689-4700 (2013)
45. Zima, V., Witschas, K., Hynkova, A., Zimova, L., Barvik, I., Vlachova, V.: *Neuropharmacology* 93, 294-307 (2015)
46. Samad, A., Sura, L., Benedikt, J., Ettrich, R., Minofar, B., Teisinger, J., Vlachova, V.: *Biochemical Journal* 433, 197-204 (2011)

47. Kim, D.,Cavanaugh, E.J.: *The Journal of Neuroscience* 27, 6500-6509 (2007)
48. Sura, L., Zima, V., Marsakova, L., Hynkova, A., Barvik, I.,Vlachova, V.: *Journal of Biological Chemistry* 287, 18067-18077 (2012)
49. Gracheva, E.O., Ingolia, N.T., Kelly, Y.M., Cordero-Morales, J.F., Hollopeter, G., Chesler, A.T., Sanchez, E.E., Perez, J.C., Weissman, J.S.,Julius, D.: *Nature* 464, 1006-1011 (2010)
50. Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T.,Nilius, B.: *The Journal of Neuroscience* 27, 9874-9884 (2007)
51. Nilius, B.,Flockerzi, V.: *Handbook of Experimental Pharmacology* 223, 1239-1280 (2014)
52. Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G.,Voets, T.: *The Journal of Physiology* 567, 35-44 (2005)
53. Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G.,Nilius, B.: *The Journal of Biological Chemistry* 279, 15223-15230 (2004)
54. Takaya, J., Mio, K., Shiraishi, T., Kurokawa, T., Otsuka, S., Mori, Y.,Uesugi, M.: *Journal of the American Chemical Society* 137, 15859-15864 (2015)
55. Andersson, D.A., Gentry, C., Moss, S.,Bevan, S.: *The Journal of Neuroscience* 28, 2485-2494 (2008)
56. Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I.,Julius, D.: *Cell* 124, 1269-1282 (2006)
57. Stenger, B., Zehfuss, F., Muckter, H., Schmidt, A., Balszuweit, F., Schafer, E., Buch, T., Gudermann, T., Thiermann, H.,Steinritz, D.: *Archives of Toxicology* 89, 1631-1643 (2015)
58. Macpherson, L.J., Geierstanger, B.H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S.R., Hwang, S.,Patapoutian, A.: *Current Biology* 15, 929-934 (2005)
59. Podhradský, D., Drobnica, L.,Kristian, P.: *Experientia* 35, 154-155
60. Hanschen, F.S., Bruggemann, N., Brodehl, A., Mewis, I., Schreiner, M., Rohn, S.,Kroh, L.W.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 7735-7745 (2012)
61. Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y., Yamamoto, S., Naito, S., Knevels, E., Carmeliet, P., Oga, T., Kaneko, S., Suga, S., Nokami, T., Yoshida, J.,Mori, Y.: *Nature Chemical Biology* 7, 701-711 (2011)
62. Pozsgai, G., Hajna, Z., Bagoly, T., Boros, M., Kemeny, A., Materazzi, S., Nassini, R., Helyes, Z., Szolcsanyi, J.,Pinter, E.: *European Journal of Pharmacology* 689, 56-64 (2012)
63. Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, T.I., de la Roche, J., Fischer, M., Suarez, S.A., Bikiel, D., Dorsch, K., Leffler, A., Babes, A., Lampert, A., Lennerz, J.K., Jacobi, J., Marti, M.A., Doctorovich, F., Hogestatt, E.D., Zygmunt, P.M., Ivanovic-Burmazovic, I., Messlinger, K., Reeh, P.,Filipovic, M.R.: *Nature Communications* 5, 4381 (2014)
64. Xiao, B., Dubin, A.E., Bursulaya, B., Viswanath, V., Jegla, T.J.,Patapoutian, A.: *The Journal of Neuroscience* 28, 9640-9651 (2008)
65. Talavera, K., Gees, M., Karashima, Y., Meseguer, V.M., Vanoirbeek, J.A., Damann, N., Everaerts, W., Benoit, M., Janssens, A., Vennekens, R., Viana, F., Nemery, B., Nilius, B.,Voets, T.: *Nature Neuroscience* 12, 1293-1299 (2009)
66. Fischer, M.J., Leffler, A., Niedermirtl, F., Kistner, K., Eberhardt, M., Reeh, P.W.,Nau, C.: *The Journal of Biological Chemistry* 285, 34781-34792 (2010)

67. Zhang, H., Wickley, P.J., Sinha, S., Bratz, I.N., Damron, D.S.: *Anesthesiology* 114, 1169-1179 (2011)
68. Lee, Y., Montell, C.: *The Journal of neuroscience : The Official Journal of The Society for Neuroscience* 33, 6716-6725 (2013)
69. Wang, H., Schupp, M., Zurborg, S., Heppenstall, P.A.: *The Journal of Physiology* 591, 185-201 (2013)
70. Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B., Voets, T.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1273-1278 (2009)
71. Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J.O., Sun, C., Walter, K., Yao, B., Kim, D.: *Nature Communications* 4, 2501 (2013)
72. Jabba, S., Goyal, R., Sosa-Pagan, J.O., Moldenhauer, H., Wu, J., Kalmeta, B., Bandell, M., Latorre, R., Patapoutian, A., Grandl, J.: *Neuron* 82, 1017-1031 (2014)
73. Rohacs, T., Nilius, B.: *Pflugers Arch* 455, 157-168 (2007)
74. Taylor, W.R.: *Journal of Theoretical Biology* 119, 205-218 (1986)
75. Betts, M.J., Russell, R.B.: *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*, v knize *Bioinformatics for Geneticists* ed.) John Wiley & Sons, Ltd. (2003)
76. Akabas, M.H., Stauffer, D.A., Xu, M., Karlin, A.: *Science* 258, 307-310 (1992)
77. Hille, B.: *Ionic channels of excitable membranes*. 3. Ed., Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts (2001)

