

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



**Functional and structural study of thermally activated TRP ion
channels:
The role of evolutionarily conserved motifs in the TRPA1 modulation**

Mgr. Anna Kádková

Supervisor: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Prague 2016

Abstract

Ankyrin receptor TRPA1 is an ion channel widely expressed on primary afferent sensory neurons, where it acts as a polymodal sensor of nociceptive stimuli. Apart from pungent chemicals (e. g. isothiocyanates, cinnamaldehyde and its derivatives, acrolein, menthol), it could be activated by cold temperatures, depolarizing voltages or intracellular calcium ions.

TRPA1 channel is a homotetramer in which each subunit consists of cytoplasmic N and C termini and a transmembrane region. The transmembrane part is organized into six alpha-helices connected by intra- and extracellular loops. The N terminus comprises a tandem set of 16 to 17 ankyrin repeats (AR), while the C terminus has a substantially shorter, dominantly helical structure. In 2015, a partial cryo-EM structure of TRPA1 was resolved. However, the functional roles of the individual regions of the receptor have not yet been fully understood.

This doctoral thesis is concerned to elucidate the role of highly conserved sequence and structural motifs within the cytoplasmic termini and the S4-S5 region of TRPA1 in voltage- and chemical sensitivity of the receptor. The probable binding site for calcium ions that are the most important physiological modulators of TRPA1 was described by using homology modeling, molecular-dynamics simulations, site-directed mutagenesis and electrophysiological techniques. Next, the molecular mechanism of a heritable disorder called “familial episodic pain syndrome”, which is caused by a point mutation within the S4-S5 region, has been proposed. The last part of this thesis is focused on the functional role of T/SPLH motifs within the N-terminal ankyrin repeats AR2, AR6 and AR11-13 in the TRPA1 modulation.

Key words: Ankyrin receptor (TRPA), C terminus, N terminus, S4-S5 region, structure-function relationship, calcium ions, voltage-dependent gating, point mutation.

1. Introduction

Transient Receptor Potential (TRP) channels represent a relatively ancient family of cation channels that have been found in many eukaryotic organisms except for plants¹. They are expressed in both excitable and non-excitable tissues where they play key roles in sensory signal transduction (such as nociception, chemical and temperature sensation or taste transduction) and homeostatic functions (e. g. Ca^{2+} and Mg^{2+} reabsorption or osmoregulation). TRP channels exhibit membrane topology similar to voltage-gated potassium channels (Kv), which is characterized by tetrameric organization of receptor subunits (Fig. 1A). Each subunit contains six transmembrane helices (S1 - S6) with a pore-forming loop between S5 and S6 and cytoplasmically located N and C termini² (Fig. 1B).

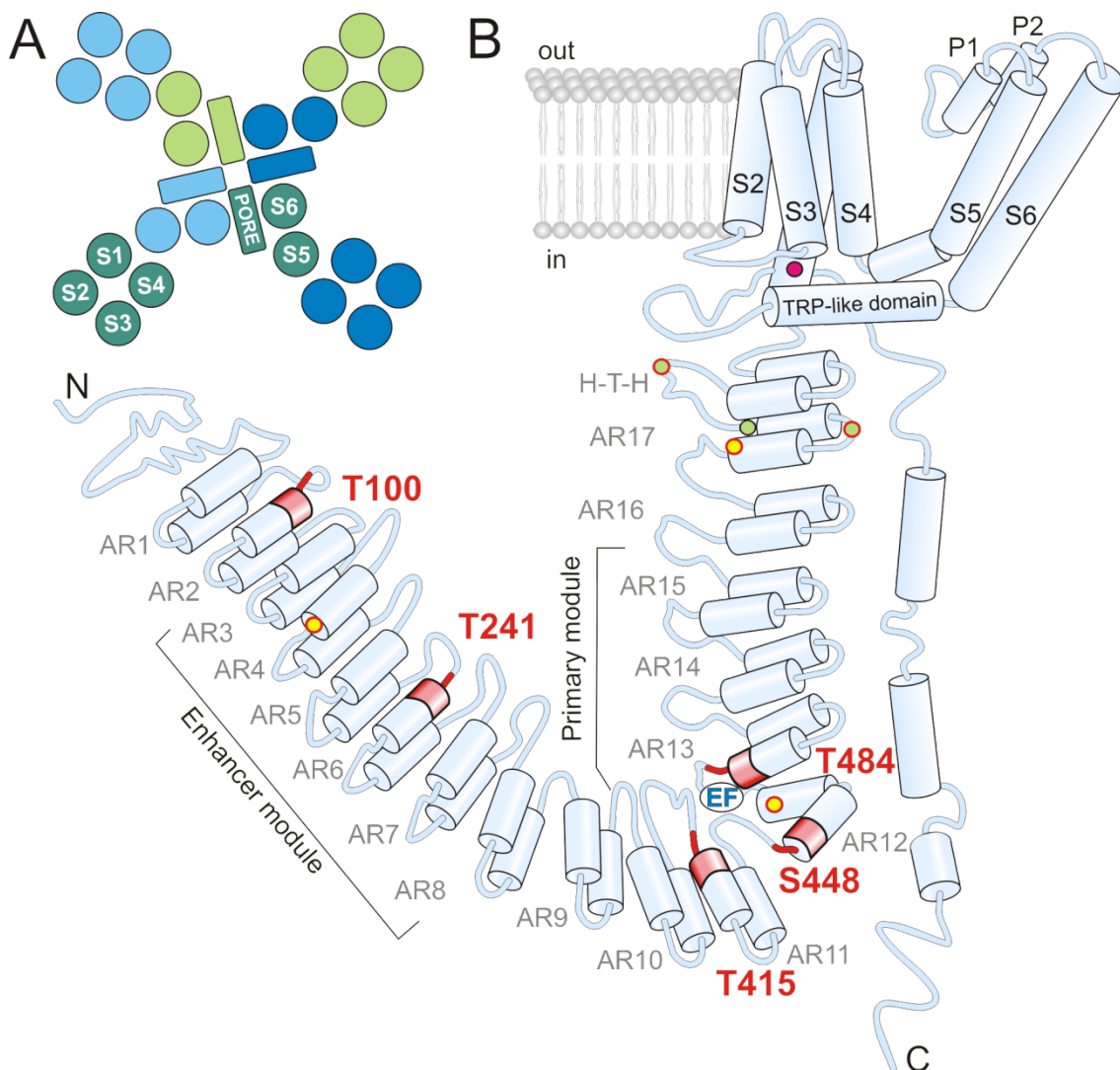


Figure 1. Topology of TRPA1. (A) Conserved architecture of tetrameric channels with six transmembrane segments (S1-S6). Four S5 - pore helix - S6 motifs form an ion conducting pore whereas helices S1-S4 from each subunit form a separate „sensor domain“. (B) Schematic of one hTRPA1 channel subunit. Conserved threonines and serine from ankyrin repeats (AR) containing T/SPLH tetrapeptide motifs are indicated in red, reactive cysteine residues (C621, C641 and C665) are represented by green circles, reactive lysine residue (K710) is depicted by a pink circle. Cysteine residues involved in forming disulphide bonds are represented by either yellow or green circles with a red edge. The Ca^{2+} - binding EF-hand like domain is depicted as “EF”.

TRPA1 is unique among mammalian TRP channels in bearing an extensive cytoplasmic amino terminus (720 of 1119 amino acids) consisting of a tandem array of 17 ankyrin repeats (AR1-AR17), and a linker that connects ankyrin repeat domain with the first transmembrane segment³⁻⁵. Five of the ARs contain a strictly conserved T/SPLH tetrapeptide motif, a hallmark of the consensus ankyrin repeat sequence contributing substantially to local conformational stability^{6,7} (Fig. 1B). This non-selective cation channel can be activated in response to various irritant chemicals, such as allyl isothiocyanate or cinnamaldehyde, or, in the absence of any agonist, by depolarizing voltages^{8,9}.

Probably the most important physiological modulators of TRPA1 are Ca²⁺ ions. The intracellular Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum or calcium ions passing through the channel pore from the extracellular space can influence the most important properties of the channel: conductance, ion selectivity and opening probability¹⁰⁻¹². At micromolar concentrations, intracellular Ca²⁺ strongly amplify the agonist- and voltage-induced TRPA1 currents. This potentiation is followed by an inactivation, which is almost complete and irreversible and both these processes can be accelerated by a higher concentration of Ca²⁺¹³. The exact molecular mechanisms of these processes, however, have not yet been fully understood.

Generally, the TRPA1 channel is associated with physiological and pathophysiological pain. In addition, mutations within the *Trpa1* gene cause heritable pain disorders such as familial episodic pain syndrome¹⁴ and paradoxical heat sensation in neuropathic patients¹⁵.

Despite more than a decade of intensive research on TRPA1, the molecular mechanisms of channel gating remain largely unknown. This thesis focuses on the functional and structural role of the evolutionarily conserved motifs within the TRPA1 cytoplasmic termini and the S4-S5 linker in agonist- and voltage-induced gating, and calcium-dependent modulation.

2. Aims of the study

- To elucidate the involvement of strictly conserved S/TPLH motifs within the N terminus of TRPA1 in voltage-, Ca²⁺- and chemically-induced gating.
- To map the putative phosphorylation sites for cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) within the TRPA1 channel.
- To clarify the structural basis of the TRPA1 related channelopathy caused by a gain-of-function mutation N855S within the S4-S5 linker.
- To investigate the contribution of the acidic cluster in the distal C terminus of TRPA1 in Ca²⁺- and voltage-dependent potentiation and/or inactivation of agonist-induced responses.
- To elucidate the function of the distal C terminus using truncated TRPA1 mutants.

3. Material and Methods

3.1 Cell cultures and transfection

Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells were cultured in Opti-MEM I media (Invitrogen) supplemented with 5% fetal bovine serum. Cells were transiently co-transfected with 400 ng of cDNA plasmid encoding wild-type (WT) or mutant human TRPA1 (wild type in the pCMV6-XL4 vector, OriGene) and with 200 ng of GFP plasmid (TaKaRa) per 1.6 mm dish using the magnet-assisted transfection (IBA GmbH.) technique. The mutants were generated by PCR using a QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and confirmed by DNA sequencing (GATC Biotech). The cells were used 24–48 h after transfection. At least three independent transfections were used for each experimental group. The wild-type channel was regularly tested in the same batch as the mutants.

3.2 Electrophysiology

Whole-cell membrane currents were recorded by employing an Axopatch 200B amplifier and pCLAMP 10 software (Molecular Devices). Patch electrodes were pulled from a glass tube with a 1.65-mm outer diameter. The tip of the pipette was heat-polished, and its resistance was 3–5 M Ω . Series resistance was compensated by at least 70% in all recordings. The experiments were performed at room temperature (23–25 °C). Only one recording was performed on any one coverslip of cells to ensure that recordings were made from cells not previously exposed to chemical stimuli. A system for rapid superfusion and heating of the cultured cells was used for drug application¹⁶.

The control bath solution contained 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, adjusted to pH 7.3 and 320 mOsm. The extracellular bath solutions contained: 150 mM NaCl and 10 mM HEPES, with an added 2 mM HEDTA for the Ca²⁺-free solution, and 2 mM or 10 mM CaCl₂ for the Ca²⁺-containing solution, adjusted to pH 7.3 with NaOH, 300 mOsm.

The whole-cell pipette solution contained the high buffer internal solution: 145 mM CsCl, 5 mM EGTA, 3 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 2 mM MgATP, pH 7.3, adjusted with CsOH, 290 mOsm. All of the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

3.3 Analysis of electrophysiological data

All of the electrophysiological data were analyzed using pCLAMP 10 (Molecular Devices), and curve fitting and statistical analyses were done in SigmaPlot 10 (Systat Software Inc.). Statistical significance was determined by Student's *t*-test or the analysis of variance, as appropriate. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

4. Results and Discussion

4.1 Effects of mutations within strictly conserved T/SPLH motifs on the TRPA1 stability

The N-terminal part of TRPA1 constitutes more than a half of the protein size. It is characterized by a prominent ankyrin repeat domain (ARD) consisting of a tandem array of 17 ankyrin repeats (ARs) and a linker region connecting the ARD with the first transmembrane segment^{3,4} (Fig. 1B). Five of the ARs contain a strictly conserved T/SPLH tetrapeptide motif, in which proline initiates the first α -helix, whereas the pair of threonine and histidine forms intra- and inter-repeat bonds substantially contributing to local conformational stability of the AR^{6,7}. We hypothesized that the strict conservation within the evolutionary conserved T/SPLH motifs in AR2, AR6, AR11-AR13 across different species suggests that an especially precisely tuned stability of these N-terminal modules is essential for the proper functioning of the TRPA1 channel. Thus, we constructed mutants either within the T/SPLH motif or in the neighboring ankyrin repeat to either stabilize (by inserting the consensus motif GxTPLH into the neighboring AR) or destabilize (by mutation of threonine or serine to alanine or aspartate) the conformation of each of the T/SPLH-containing AR.

Surprisingly, stabilization or destabilization of the T/SPLH consensus motifs resulted in very different phenotypes depending on location of the ankyrin repeat containing the motif within the N terminus. In addition, mutations within the T/SPLH motifs affected different modalities of the TRPA1 channel gating depending on the specific location of the motif-containing ankyrin repeat.

The T100A mutant within the AR2 exhibited a decreased basal conductance at negative membrane potentials, indicating disturbed closed–open equilibrium in favor of the closed state. In contrast, the double mutation M131G/A133T in AR3 resulted in a gain of function phenotype, where the channel displayed significant voltage-independent gating at negative membrane potentials, suggesting that the energy required to activate the pore opening is reduced (Fig. 2A and 2B). During the application of cinnamaldehyde, the T100A-mediated whole-cell outward currents were almost identical to those of the wild-type channels, but significantly reduced in an inward direction, matching the above-described reduction in voltage-induced currents at hyperpolarizing membrane potentials. The double mutant M131G/A133T channels displayed much larger responses to cinnamaldehyde at both negative and positive holding potentials. These observations identify AR2 to be a domain contributing to voltage-dependent gating.

Both mutations of threonine T241 in AR6 (T241A and T241D) remained functional, which suggests that strict TPLH conservation is not crucial for TRPA1 functioning. To further investigate the role of TPLH in AR6, we next constructed two additional mutants. The first, K239G, was anticipated to improve the ankyrin fold and allow for a more compact L shape of the repeat AR6. The second mutant, H244R, was designed to perturb AR6 by decreasing its mechanical stability¹⁷. Both the mutants yielded smaller currents in response to depolarizing voltages and also smaller maximal responses to chemical activators. This serious mutagenic impact was quite surprising in case of K239G mutation, which conforms to the consensus glycine two residues prior to the TPLH motif, most likely due to eliminating important interactions in the loop preceding AR6.

Our results suggest that the ankyrin repeats AR2 and AR6, although sequentially distant from the transmembrane region, contribute to voltage-dependent gating. The recently resolved structure of TRPA1 provides a mechanistic explanation of how the proximal part of ARD can communicate with the channel gate: the information from the

ARD can be transduced through the overlying helix-turn-helix motif of the linker region that forms a network of packed interactions with the TRP-like domain.

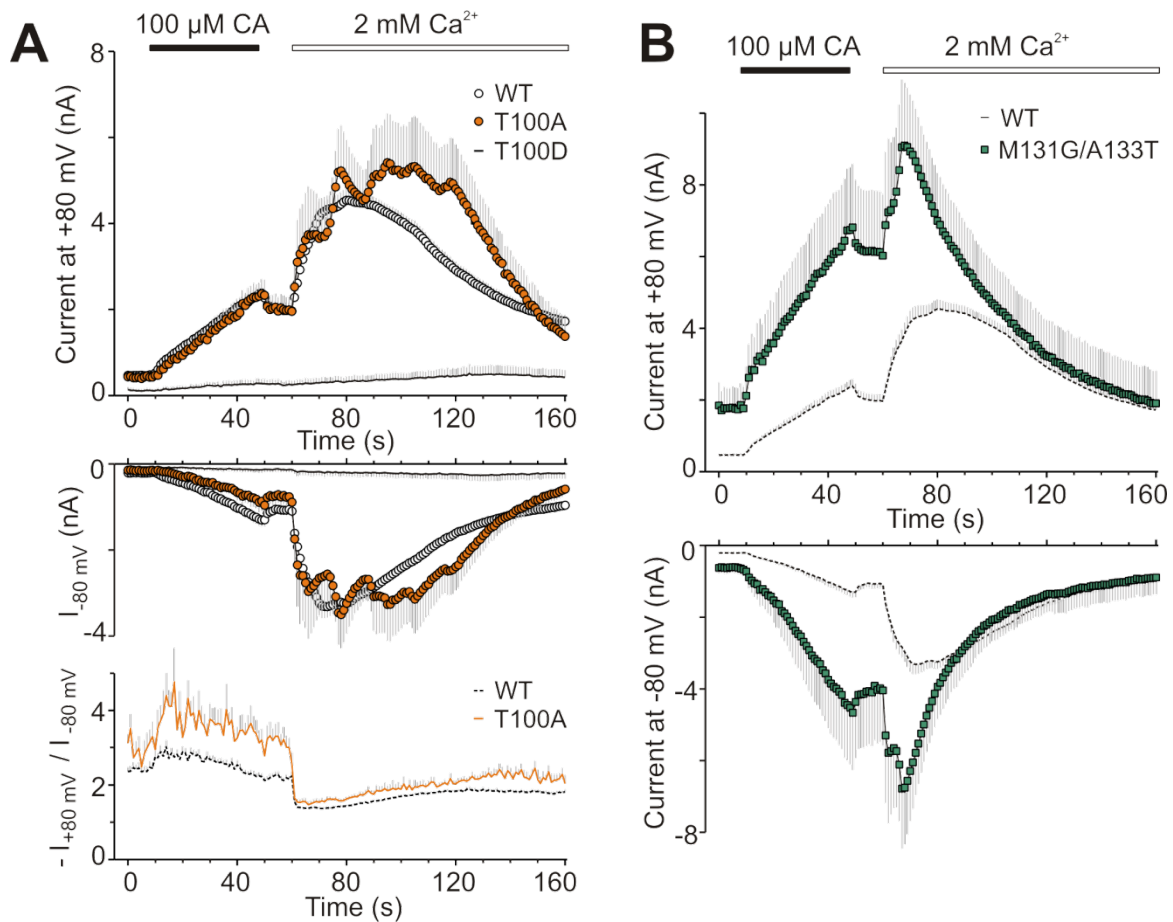


Figure 2. Mutations affecting the conformational stability of the ankyrin repeat 2 and 3 affect voltage-dependent TRPA1 channel gating. (A and B) Time course of average whole-cell currents through wild-type and mutant hTRPA1 measured at +80 mV and -80 mV as marked. The application of 100 μM cinnamaldehyde (CA) and subsequent addition of 2 mM Ca^{2+} are indicated above. Below, average rectification of currents shown above.

Notably, both mutations of serine S448 (S448A and S448D) in AR12 failed to produce any measurable currents. Given a high degree of conservation among all TRPA1 channels in this region, we hypothesized that if S448 contributes substantially to ARD stability through intra- and inter-repeat hydrogen bonding, then the threonine at this position could improve ancillary interactions in its microenvironment by hydrophobic interactions associated with the threonine methyl group⁶. A remarkable finding was an apparent difference between the characteristic currents induced by cinnamaldehyde and AITC in S448T. The currents induced by 100 μM cinnamaldehyde were significantly greater and, upon the addition of Ca^{2+} to the bath solution, reached amplitudes that were ~1.4-fold the amplitude of the wild-type channels. The currents resembled wild-type TRPA1 in terms of the extent of Ca^{2+} -dependent desensitization. In a striking contrast, the maximum currents induced by AITC were smaller than in the wild-type channels and exhibited only a slight calcium-dependent desensitization (Fig. 3A and 3B).

While serine is statistically three times less favored than threonine in T/SPLH tetrapeptides⁶, the role of S448 in TRPA1 is likely to be specific and may be evolutionarily fine-tuned. As the expression level of the S448T mutant did not

significantly differ from wild-type, we believe that the S448T mutation results in a gain-of-function by mainly impacting the transition between the closed and open state of the channel in a way that is independent of the putative voltage sensor.

Taken together, our data support the previous suggestion that calcium-dependent desensitization of AITC-induced responses is specified by an AR cluster centered around AR11¹⁸. Moreover, we show that subtle changes in AR12 stability affect the Ca²⁺-dependent desensitization to varying degrees according to the mode of chemical activation, and increase the voltage-independent component of TRPA1 channel gating.

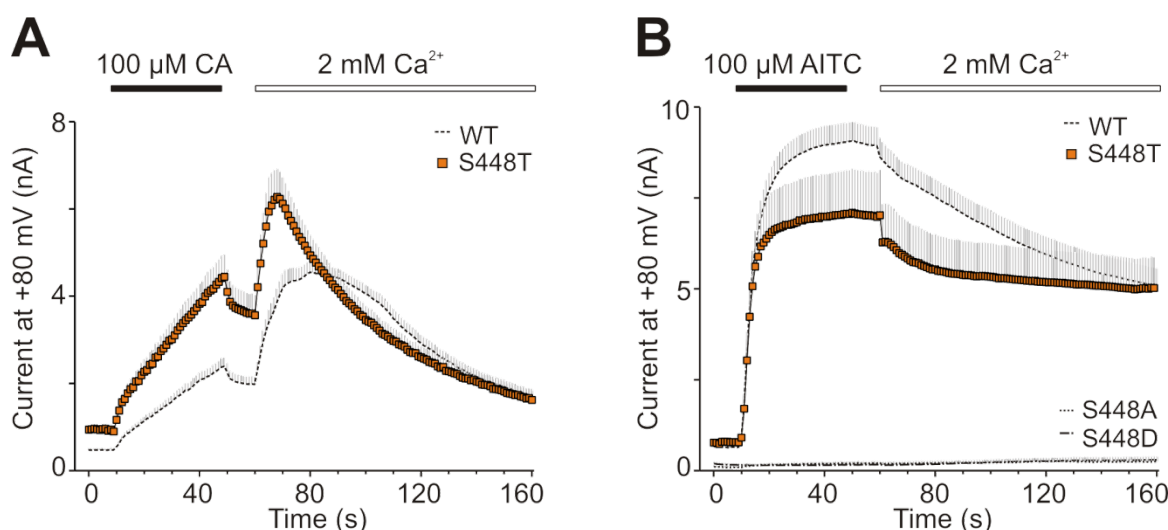


Figure 3. Strict conservations of the SPLH motif in AR12 is required for functional interactions. (*A and B*) Time course of average whole-cell currents through wild-type and mutant hTRPA1 measured at +80 mV. The application of 100 μ M cinnamaldehyde (CA, in panel (A)) or 100 μ M allyl isothiocyanate (AITC, in panel (B)) and subsequent addition of 2 mM Ca²⁺ are indicated above. Note that the S448T mutant exhibits greater currents in CA but not in the presence of AITC. Mutations S448A and S448D are AITC-insensitive.

4.2 Conserved T/SPLH motifs as putative phosphorylation sites

Except for the role in the ankyrin repeat conformational stability, the T/SPLH motifs may represent potential phosphorylation sites, particularly for proline-directed Ser/Thr kinases. Among these, cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is a neuron-specific kinase of great functional relevance, known to regulate nociceptive signaling via the N terminus of the related vanilloid receptor TRPV1¹⁹.

We tested whether the co-expression of TRPA1 with Cdk5 and p35 protein, a Cdk5-specific activator, may modulate voltage-dependent channel activation. The co-expression of p35 alone or with Cdk5 in HEK 293T cells significantly increased the cinnamaldehyde-evoked responses of hTRPA1. Thus, we hypothesized that TRPA1 may be a substrate for the Cdk5/p35 complex and/or its interaction with p35 may stabilize the activated state of the channel.

Bioinformatics analysis of the primary sequence of human TRPA1 predicted threonines T100, T241, T415, T484 and serine S448 to be consensus phosphorylation sites for Cdk5 at a high stringency level. However, our data suggest that the examined serine and threonine residues constituting the conserved T/SPLH motifs are not likely to be involved in the phosphorylation of TRPA1 because the phosphonull alanine mutations

and phosphorylation mimicking aspartate mutations did not lead to opposite changes in the channel functioning.

Further sequence prediction analysis of the TRPA1 N terminus revealed other three putative phosphorylation sites for Cdk5, serine and threonine residues S344, S616 and T673. Therefore, we constructed alanine and aspartate additional mutants of these residues to obtain a complete picture of the role of the T/SP N-terminal motifs. Among these, the T673D mutation resulted in channels whose responses to cinnamaldehyde were increased almost threefold compared to wild-type. According to the recently resolved TRPA1 structure, threonine 673 is solvent-accessible and located in a flexible loop connecting the β -strands to the helix-turn-helix motif preceding the pre-S1 helix, indicating that it may represent a candidate target for Ser/Thr phosphorylation.

4.3 Structural basis of the heritable episodic pain syndrome

Our second study was motivated by the previous finding of a gain-of-function mutation N855S within the S4-S5 linker of hTRPA1, which underlies familial episodic pain syndrome¹⁴. In our work, we applied homology modeling, molecular dynamics simulations and whole-cell electrophysiology to explore the structural basis of this channelopathy.

The model based on the Kv1.2/2.1 structure (pdb code 2R9R) revealed an inter-subunit interaction between the polar glutamate residue E854 located in the S4-S5 linker in the immediate vicinity of N855, and lysine K868 in S5 transmembrane helix of an adjacent subunit of TRPA1. According to this finding, we hypothesized that the functional changes in the N855S mutant may originate, at least in part, from changes in inter-subunit interactions (Fig. 4A).

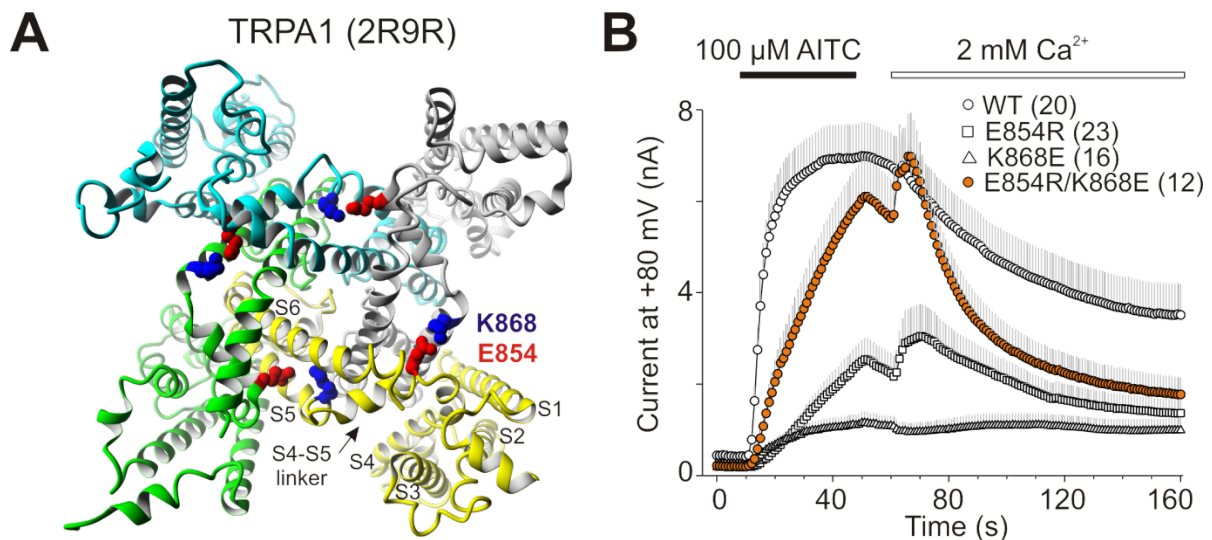


Figure 4. (A) Intracellular view of homology model of TRPA1 channel based on Kv1.2/2.1 paddle chimera with E854 and K868 residues indicated. (B) Time course of average whole-cell currents through wild-type and mutant hTRPA1 measured at +80 mV. The application of 100 μ M allyl isothiocyanate (AITC) and subsequent addition of 2 mM Ca^{2+} are indicated above.

We used whole-cell patch clamp recordings to investigate, whether the predicted inter-subunit interactions contribute to the TRPA1 channel functionality. We constructed

charge-neutralizing (E854A, K868A) and charge-reversing (E854R, K868E) mutants of TRPA1 to test whether specific interactions between opposite charges are required for proper channel functioning. Furthermore, we constructed the charge-swapping double mutant E854R/K868E to test whether the double mutant might functionally rescue the channel.

Our data indicate that substitutions at E854 and K868 result in channels with altered gating kinetics. Mutations at position K868 destabilized the closed, resting conformation of the channel and strongly reduced responses to all stimuli (depolarizing voltage, AITC). The E854A and E854R mutants expressed AITC-sensitive channels, however, their responses to depolarizing voltage steps were smaller in amplitude than wild type. The charge-swapping mutation E854R/K868E restored normal channel closure at hyperpolarizing voltages, although it did not rescue normal voltage dependency. However, the maximal amplitudes of AITC-induced responses of the double mutant were not significantly different from wild-type channels, although the onset of the E854R/K868E currents was apparently slower (Fig. 4B). The finding that the charge-swapping double mutation substantially rescues the functionality of TRPA1 supports the hypothesis that the spatial proximity of the two residues E854 and K868.

According to our data, the altered calcium sensitivity of the N855S mutant may arise from its vicinity to the residues E854 and K868 that are involved in allosteric coupling and voltage sensing. In addition, the selective disruption of voltage-dependent gating in the charge-swap E854R/K868E indicates that these residues can be a part of a voltage-sensing domain of TRPA1.

4.4 C-terminal acidic cluster is involved in Ca²⁺-induced modulation of hTRPA1

Calcium ions belong to the most important physiological modulators of TRPA1. Therefore, our last project was focused on elucidating molecular mechanisms of Ca²⁺-dependent potentiation and inactivation of the TRPA1 channel, which still remain a matter of controversy.

The obvious candidates for a domain through which Ca²⁺ can modulate TRPA1 are acidic residues on the intracellular side of TRPA1. Within the C terminus, a highly conserved sequence of acidic amino acids, ¹⁰⁷⁷ETEDDD¹⁰⁸², shares the sequence similarity with so-called Ca²⁺ bowl domain of the superfamily of BK channels²⁰. To confirm the involvement of the ¹⁰⁷⁷ETEDDD¹⁰⁸² motif in Ca²⁺-mediated modulation we used site-directed mutagenesis, whole-cell electrophysiology, homology modeling and molecular dynamics simulations.

As the first step, all negatively charged residues were individually mutated to alanine, a neutral amino acid. Except for E1077A, none of the mutant exhibited a substantially decreased relative sensitivity to cinnamaldehyde compared to WT TRPA1. However, the kinetics of the Ca²⁺-dependent potentiation was dramatically changed in four out of the six charge-neutralized mutants: E1073A, D1080A, D1081A and D1082A (Fig. 5A and 5B).

This observation further supports the idea that the whole region containing the negatively charged cluster is structurally important and involved in the Ca²⁺-dependent modulation of TRPA1. Therefore, we utilized molecular dynamics (MD) simulations to probe the Ca²⁺-binding capability of the acidic region from TRPA1, using Ca²⁺ activation apparatus of the human BK channel²⁰ as the template protein (pdb code 3MT5). After replacing the stretch of 10 consecutive residues ⁸⁸⁹QFLDQDDDD⁸⁹⁸ in the structure of

the Ca^{2+} -binding domain of BK with 10 residues from human TRPA1 ($^{1074}\text{I I S E T E D D D S}^{1083}$), the MD simulations confirmed that this region is capable of binding Ca^{2+} . Furthermore, we showed that the two residues D1080 and D1082 use oxygen atoms from their side chains for direct contact with calcium ions, which is in a good agreement with our experimental data (Fig. 5C).

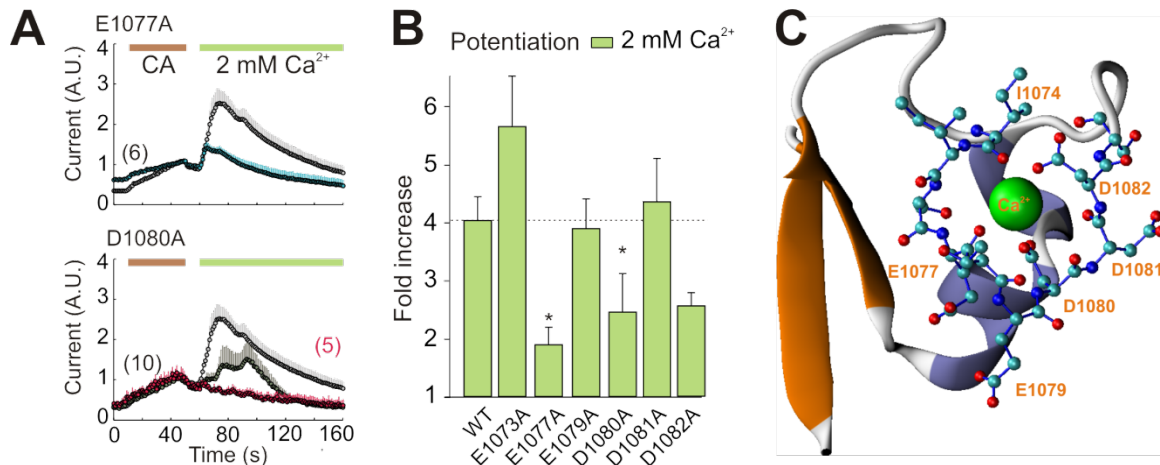


Figure 5. Negatively charged motif $^{1074}\text{IISETEDDDS}^{1083}$ is involved in Ca^{2+} -dependent modulation of human TRPA. (A) Average TRPA1 currents evoked in response to 40 s exposure to 100 μM cinnamaldehyde (CA) and subsequent addition of 2 mM Ca^{2+} as indicated by horizontal bars. The currents are normalized to their maximal cinnamaldehyde responses obtained prior to the addition of Ca^{2+} to the bath solution. For D1080A, the average current for nonpotentiated cells (in red) is overlaid onto the average current from all cells. (B) Calcium-induced potentiation was measured as the fold increase in current, measured at +80 mV, following the addition of 2 mM extracellular Ca^{2+} . The *asterisks* indicate significant differences between mutant and wild-type TRPA1. (C) Illustration of calcium-binding site in hSlol-TRPA1 chimera with surrounding structures. Residues from the TRPA1 protein are shown in ball and stick representation.

4.5 Functional role of the distal C terminus of hTRPA1

As the final step of the study, we constructed two C-terminal truncation mutants, TRPA1- $\Delta 20$ and TRPA1- $\Delta 26$ to investigate the role of the distal part of the hTRPA1 carboxy terminus. In the TRPA1- $\Delta 20$ mutant, stop codon was introduced at N1100, which removed the last predicted C-terminal α -helix H6. In the TRPA1- $\Delta 26$ mutant, stop codon was introduced at E1094 (within the H5 helix) to preserve the structure of the loop containing the calcium-binding motif $^{1074}\text{IISETEDDDS}^{1083}$.

Mutation TRPA1- $\Delta 26$ did not produce measurable currents in response to any of the stimuli tested, indicating an important functional role of the predicted H5 helix. In contrast, the TRPA1- $\Delta 20$ truncation mutant was functional. Unlike the wild-type channel, this mutant exhibited strikingly slower inactivation upon the addition of Ca^{2+} while it exhibited normal degree of Ca^{2+} -potentiation and normal responsiveness to voltage and Cin (Fig. 6). This set of experiments identified the distal C terminus as a critical modulatory domain of TRPA1 involved in its Ca^{2+} -dependent inactivation.

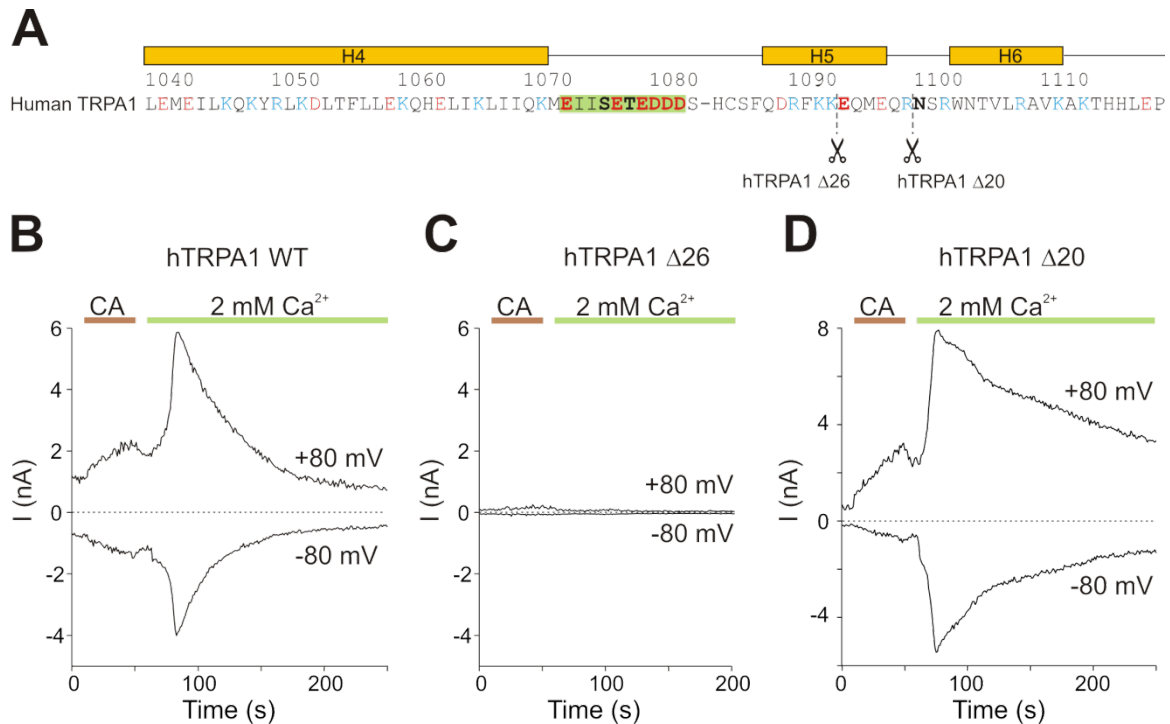


Figure 6. Truncations in C terminus reveal region involved in Ca^{2+} -dependent inactivation. (A) Amino acid sequence of the distal C terminus. Predicted secondary structure for hTRPA1 is indicated above the alignment. The region of interest is boxed. Residues mutated in this study are indicated in bold. (B) Time course of representative whole-cell currents through wild-type hTRPA1 measured at -80 mV and +80 mV. The application of 100 μM cinnamaldehyde (CA) and subsequent addition of 2 mM Ca^{2+} are indicated above. (C and D) Voltage-ramp protocol as in (A) used for truncation mutants. Note the obviously slower inactivation of the TRPA1- Δ 20 truncation mutant upon the addition of 2 mM Ca^{2+} compared with WT.

5. Conclusions

- The most conserved N-terminal consensus T/SPLH tetrapeptide motifs, which initiate the helix–turn–helix conformation of the repeats AR2, AR6, AR11, AR12 and AR13, are required for the proper functioning of TRPA1 and distinctly contribute to its multimodal activation.
- Stabilizing mutations of AR2 and its neighboring AR3 affect voltage-dependent TRPA1 channel gating. Strict conservation of the T/SPLH motifs in AR11-AR13 is required for functional interactions, and most likely not for targeting TRPA1 to the plasma membrane.
- Conserved T/SPLH motifs from ARD are not likely to be phosphorylated by Cdk5. The only residue fulfilling the consensus requirement and upregulating the function of TRPA1 under phospho-mimicking conditions is T673, which is outside the ARD.

- Homology modeling and molecular dynamics simulations revealed a salt bridge between residues E854 within the S4-S5 linker of one TRPA1 subunit and K868 in S5 domain from another subunit. Disturbance of this interaction causes changes in activation of the N855S mutant channel, which underlies the familial episodic pain syndrome.
- C-terminal acidic cluster E1077 – D1082 is capable for binding Ca^{2+} and contributes to Ca^{2+} -dependent modulation of TRPA1.
- Intact end (last 20 AA) of the C terminus is essential for proper calcium-dependent inactivation of the TRPA1 channel.

6. References

1. Nilius, B. & Flockerzi, V. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. Volume II. Handbook of Experimental Pharmacology* **223**, (2014).
2. Vannier, B., Zhu, X., Brown, D. & Birnbaumer, L. The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J. Biol. Chem.* **273**, 8675–8679 (1998).
3. Paulsen, C. E., Armache, J., Gao, Y., Cheng, Y. & Julius, D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **520**, 511–517 (2015).
4. Cvetkov, T. L., Huynh, K. W., Cohen, M. R. & Moiseenkova-Bell, V. Y. Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **286**, 38168–38176 (2011).
5. Brewster, M. S. J. & Gaudet, R. How the TRPA1 receptor transmits painful stimuli: Inner workings revealed by electron cryomicroscopy. *BioEssays* **37**, 1184–1192 (2015).
6. Guo, Y. *et al.* Contributions of conserved TPLH tetrapeptides to the conformational stability of ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **399**, 168–181 (2010).
7. Yuan, C. *et al.* The study of pH-dependent stability shows that the TPLH-mediated hydrogen-bonding network is important for the conformation and stability of human gankyrin. *Biochemistry* **52**, 4848–4857 (2013).
8. Bandell, M. *et al.* Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849–857 (2004).
9. Jordt, S.-E. *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260–265 (2004).
10. Cavanaugh, E. J., Simkin, D. & Kim, D. Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca^{2+} reveals different functional channel states. *Neuroscience* **154**, 1467–1476 (2008).
11. Karashima, Y. *et al.* Agonist-induced changes in Ca^{2+} permeation through the nociceptor cation channel TRPA1. *Biophys. J.* **98**, 773–783 (2010).
12. Nilius, B., Prenen, J. & Owsianik, G. Irritating channels: the case of TRPA1. *J. Physiol.* **589**, 1543–1549 (2011).
13. Wang, Y. Y., Chang, R. B., Waters, H. N., McKemy, D. D. & Liman, E. R. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J. Biol. Chem.* **283**, 32691–32703 (2008).
14. Kremeyer, B. *et al.* A Gain-of-Function Mutation in TRPA1 Causes Familial

- Episodic Pain Syndrome. *Neuron* **66**, 671–680 (2010).
15. Binder, A. *et al.* Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS One* **6**, (2011).
 16. Dittert, I. *et al.* Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J. Neurosci. Methods* **151**, 178–185 (2006).
 17. Lee, W., Strumpfer, J., Bennett, V., Schulten, K. & Marszalek, P. E. Mutation of conserved histidines alters tertiary structure and nanomechanics of consensus ankyrin repeats. *J. Biol. Chem.* **287**, 19115–19121 (2012).
 18. Cordero-Morales, J. F., Gracheva, E. O. & Julius, D. PNAS Plus: Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, E1184–E1191 (2011).
 19. Liu, J., Du, J., Yang, Y. & Wang, Y. Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Exp. Neurol.* **273**, 253–262 (2015).
 20. Yuan, P., Leonetti, M. D., Pico, A., Hsiung, Y. & MacKinnon, R. Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science* **329**, 182–6 (2010).

Curriculum vitae

Mgr. Anna Kádková (maiden name Hynková)

Date of birth: 30. 5. 1988

Email address: anna.kadkova@gmail.com

Education

Since 2012 Charles University in Prague, Faculty of Science, PhD. studies, study programme Biochemistry (PhD.), Dissertation thesis theme: *A functional and structural study of thermally activated TRP ion channels: The role of evolutionarily conserved motifs in the TRPA1 modulation*

2010 – 2012 Charles University in Prague, Faculty of Science, master studies, study programme Biochemistry (MSc.), Diploma thesis theme: *Modulation of the ankyrin receptor TRPA1 by divalent cations*

2007 – 2010 Charles University in Prague, Faculty of Science, bachelor studies, study programme Biochemistry (BSc.), Bachelor's thesis theme: *Binding of organic dyes to proteins. Applications in practical course in biochemistry.*

Additional training

2014 Training course for animal protection law enforcement

2015 Course: Management of Science and Innovation

Foreign languages

English – advanced, FCE exam

German – advanced, Goethe-Zertifikat B2 exam

Research experience

Since 2011 Laboratory of RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Methods: cell cultures and transfection, molecular biology methods (PCR, transformation of bacteria), electrophysiology (patch clamp), biochemical methods (western blot)

2015 Stay at University of Leeds in the laboratory of prof. Nikita Gamper, PhD.

Methods: dissection, cultivation and transfection of DRG and TG neurons, calcium imaging

Other competences

Teaching activities: Course of Receptor Neurophysiology
Molecular Basis of Nerve Excitability (practical course)

Training a post-doc (Katja Witschas, PhD.) and two undergraduate students (Jana Vašková, MSc. and Viktor Synytsya, BSc.) in electrophysiological methods

Grants and awards

2014 Award for the best presentation, „Advancement Report“, Institute of Physiology AS CR

2013 Grant Agency of the Charles University in Prague, grant No. 888513 „A functional role of the S4-S5 linker of the ankyrin transient receptor potential 1 channel (TRPA1)“

Selected publications

- 1) **Hynkova A.**, Marsakova L., Vaskova J., Vlachova V.
N-terminal tetrapeptide T/SPLH motifs contribute to multimodal activation of human TRPA1 channel
Scientific Reports, 6:28700, 2016
- 2) Zima V., Witschas K., **Hynkova A.**, Zimova L., Barvik I., Vlachova V.
Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveals inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state.
Neuropharmacology, 93: 294-307, 2015
- 3) Sura L., Zima V., Marsakova L., **Hynkova A.**, Barvik I., Vlachova V.
C-terminal acidic cluster is involved in Ca²⁺-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel.
The Journal of Biological Chemistry, 287(22):18067-77, 2012
- 4) Boukalova S., Touska F., Marsakova L., **Hynkova A.**, Sura L., Chvojka S., Dittert I., Vlachova V.
Gain-of-function mutations in the transient receptor potential channels TRPV1 and TRPA1: how painful?
Physiological Research, 63 Suppl 1:S205-13, 2014

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



**Studium funkce a struktury teplotně aktivovaných TRP iontových
kanálů: Role evolučně konzervovaných motivů v modulaci TRPA1**

Mgr. Anna Kádková

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha 2016

Abstrakt

Ankyrinový receptor TRPA1 je iontový kanál exprimovaný převážně na primárních aferentních senzoričských neuronech, kde působí jako polymodální senzor pro bolestivé a dráždivé podněty. Kromě chemických látek (např. isothiokyanáty, skořicový aldehyd a jeho deriváty, akrolein, menthol) může být aktivován chladem, depolarizací membránového potenciálu nebo vápenatými ionty z intracelulární strany.

Iontový kanál TRPA1 je homotetramerem podjednotek, jež jsou topologicky uspořádány do transmembránové oblasti a cytoplazmaticky orientovaných N- a C-konců. Transmembránová oblast je tvořena šesti alfa-helixy propojenými intra- a extracelulárními kličkami. N-konec receptoru se vyznačuje přítomností 16 až 17 ankyrinových repetitiv (AR), zatímco C-konec je výrazně kratší a má převážně helikální strukturu. Přesná struktura TRPA1 byla částečně rozřešena roku 2015 pomocí kryoelektronové mikroskopie, avšak funkční úloha jednotlivých oblastí v polymodální aktivaci receptoru není prozatím plně objasněna.

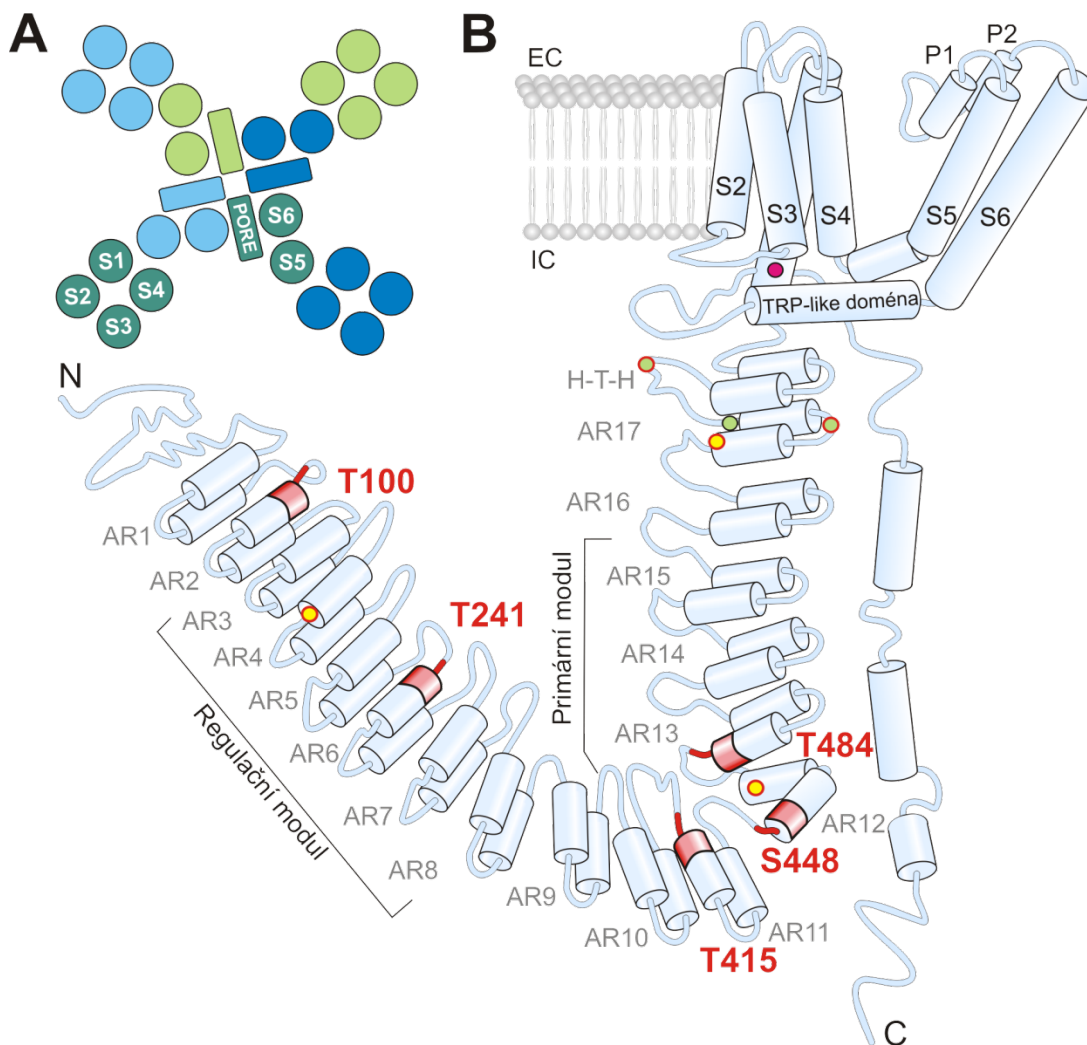
Předkládaná disertační práce se zabývá úlohou mezidruhově konzervovaných strukturních a sekvenčních motivů v cytoplazmatických koncích a v S4-S5 oblasti TRPA1 v napěťové a chemické citlivosti receptoru. Pomocí homologního modelování, molekulárně-dynamických simulací, bodové mutagenese a elektrofyziologických technik bylo popsáno možné vazebné místo pro vápenaté ionty, jež jsou nejdůležitějšími fyziologickými modulátory TRPA1. V další části práce byla navržena hypotéza, pomocí níž byla vysvětlena molekulární podstata dědičného onemocnění “familiálního epizodického bolestivého syndromu”, které je způsobeno bodovou mutací N855S v S4-S5 oblasti receptoru. Poslední část práce byla zaměřena na objasnění funkční úlohy T/SPLH motivů v ankyrinových repetitivách AR2, AR6, AR11-13 na aminovém konci v modulaci TRPA1 receptoru.

Klíčová slova: Ankyrinový receptor (TRPA), C-konec, N-konec, S4-S5 oblast, strukturně-funkční vztah, vápenaté ionty, napěťově závislé vrátkování, bodová mutace.

1. Úvod

TRP receptory (z anglického „Transient Receptor Potential“) představují evolučně starou skupinu iontových kanálů, jež se vyskytují v mnoha eukaryotních organismech s výjimkou rostlin¹. Jsou exprimovány v excitabilních i neexcitabilních tkáních, kde hrají důležitou roli v transdukcii smyslových signálů (např. v nocicepci, vnímání teploty nebo chemických látek či chuti) a v homeostatických funkcích (např. reabsorpci Ca^{2+} a Mg^{2+} nebo osmoregulaci).

Topologie TRP iontových kanálů je charakterizována symetrickým homotetramerickým uspořádáním podjednotek v plazmatické membráně (Obr. 1A). Každá podjednotka je topologicky uspořádána do šesti transmembránových helixů (S1 – S6) a cytoplazmatického N- a C-konce². Pór kanálu je tvořen segmenty S5 a S6, jež jsou spojeny klíčkou obsahující dva pórové helixy (Obr. 1B).



Obrázek 1. Topologie iontového kanálu TRPA1. (A) Schematické uspořádání transmembránových segmentů. Pórové segmenty S5 a S6 se nacházejí v blízkosti sensorické části S1-S4 sousední podjednotky. (B) Schéma podjednotky lidského TRPA1 kanálu. Konzervované seriny a threoniny z tetrapeptidových T/SPLH motivů jsou vyznačeny červeně, reaktivní cysteiny (C621, C641 a C665) jsou označeny zelenými kolečky, reaktivní lysinové reziduum K710 je označeno růžově. V červeném kroužku jsou označena rezidua tvořící intra- a intermolekulární disulfidické vazby. Symbolem „EF“ je označena doména podobná Ca^{2+} -vazebnému EF-motivu.

Ankyrinový receptor TRPA1 je jediným členem savčí rodiny ankyrinových TRP proteinů. N-konec receptoru tvoří přibližně 64% proteinu TRPA1. Obsahuje nezvykle velké množství ankyrinových repetitiv (AR1 – AR17) a část propojující cytoplazmatickou ankyrinovou doménu s prvním transmembránovým helixem³⁻⁵. Pět ankyrinových repetitiv obsahuje přísně konzervovaný tetrapeptidový motiv T/SPLH, jenž je typickou konsenzuální sekvencí, která přispívá k lokální konformační stabilitě ankyrinové repetitive^{6,7} (Obr. 1B).

TRPA1 je neselektivní iontový kanál, jenž může být aktivován řadou dráždivých látek, jakými jsou např. allyl isothiokyanát nebo skořicový aldehyd, nebo depolarizací membránového potenciálu v nepřítomnosti dalších aktivátorů^{8,9}.

Pravděpodobně nejdůležitějšími fyziologickými modulátory TRPA1 jsou vápenaté ionty. Intracelulární Ca^{2+} z endoplasmatického retikula nebo vápenaté ionty procházející pórem iontového kanálu z extracelulárního prostoru mohou ovlivnit nejdůležitější vlastnosti TRPA1 kanálu: vodivost, iontovou selektivitu a pravděpodobnost otevření¹⁰⁻¹². Vnitrobuněčné vápenaté ionty již v mikromolární koncentraci silně zesilují proudové odpovědi TRPA1 vyvolané depolarizací nebo agonistou. Tato potenciace je následována inaktivací, jež je téměř úplná a nevratná, a oba tyto procesy mohou být urychleny při vyšší koncentraci Ca^{2+} ¹³. Přesné molekulární mechanismy těchto procesů však nebyly doposud plně objasněny.

Fyziologická úloha TRPA1 receptoru je spojována s fyziologickou i patologickou bolestí. Mutace v *Trpa1* genu způsobují dědičná onemocnění: familiální epizodický bolestivý syndrom¹⁴ a paradoxní vnímání chladových podnětů u pacientů s neuropatickou bolestí¹⁵.

I přes více než desetiletí výzkumu nebyly přesné molekulární mechanismy vrátkování TRPA1 kanálu dosud plně objasněny. Předkládaná disertační práce je zaměřena na funkční a strukturální úlohu evolučně konzervovaných motivů v cytoplazmatických koncích a S4-S5 oblasti TRPA1 v napěťové a chemické citlivosti receptoru a v jeho Ca^{2+} modulaci.

2. Cíle práce

- Objasnit úlohu přísně konzervovaných S/TPLH motivů na N-konci TRPA1 v napěťově-, chemicky a vápníkově-závislém vrátkování kanálu.
- Zmapovat predikovaná fosforylační místa pro cyklin-dependentní kinázu 5 (Cdk5) v TRPA1 kanálu.
- Vysvětlit strukturální podstatu kanálopatie způsobené získanou mutací N855S v S4-S5 helixu TRPA1 receptoru.
- Zjistit, do jaké míry přispívá distální C-konec TRPA1 k Ca^{2+} - a napěťově závislé potenciaci a/nebo inaktivaci odpovědí vyvolaných agonistou.
- Objasnit funkční úlohu distálního C-konce využitím zkrácených mutací TRPA1 receptoru.

3. Materiál a metodika

3.1 Tkáňové kultury a transfekce

Lidské embryonální ledvinné buňky HEK293T byly kultivovány v 5 % roztoku fetálního telecího séra v médiu Opti-MEM I (Invitrogen). Buňky byly přechodně transfekovány 400 ng DNA kódující divoký nebo mutantní typ receptoru TRPA1 (divoký typ ve vektoru pCMV6-XL4, OriGene) spolu s 200 ng plasmidu kódujícího zelený fluorescenční protein (TaKaRa) pomocí metody MATra (IBA GmbH.). Mutantní konstrukty byly připraveny využitím PCR reakce za použití synteticky připravených primerů a kitu “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene). Výsledné produkty izolace DNA byly ověřeny sekvenací (GATC Biotech). Membránové proudy byly z buněk snímány 24–48 h po transfekci. Pro daný typ experimentu byly provedeny nejméně tři nezávislé transfekce. Ve všech experimentech s mutantními receptory byl zároveň testován divoký typ receptoru.

3.2 Elektrofyzilogická měření

Membránové proudy byly snímány pomocí elektrofyzilogické techniky terčíkového zámku (“patch clamp”). Proudly byly měřeny z celých buněk zesilovačem Axopatch 200B a programem pCLAMP 10 (Molecular Devices). Skleněné měřicí elektrody byly vytaženy z borosilikátových kapilár o vnějším průměru 1,65 mm, odpor elektrod se pohyboval mezi 3 – 5 M Ω . Sériový odpor byl u všech měření kompenzován minimálně na 70%. Měření byla prováděna při pokojové teplotě (23–25 °C). Na každý pokus bylo použito nové sklíčko s buňkami. Pro definovanou aplikaci chemických látek o přesné teplotě byl použit aplikační systém s možností rychlé výměny roztoků¹⁶.

Kontrolní roztok obsahoval 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glukosu, pH bylo upraveno na hodnotu 7.3, osmolalita byla 320 mOsm. Extracelulární roztok bez vápenatých iontů obsahoval: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES a 2 mM HEDTA. Extracelulární roztok s obsahem vápenatých iontů obsahoval: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES a 2 mM nebo 10 mM CaCl₂. pH extracelulárních roztoků bylo 7.3 a jejich osmolalita 300 mOsm.

Pro plnění elektrod byl použit intracelulární roztok obsahující 145 mM CsCl, 5 mM EGTA, 3 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 2 mM MgATP, pH 7.3 (upraveno pomocí CsOH), osmolalita 290 mOsm. Veškeré chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich.

3.3 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). Statistická významnost byla vypočtena pomocí párového *t*-testu nebo analýzy rozptylu. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hladinou významnosti $P < 0.05$.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Vliv mutací v přísně konzervovaných motivech T/SPLH na stabilitu TRPA1

Aminový konec tvoří více než polovinu velikosti TRPA1 proteinu. Je charakterizován výraznou ankyrinovou doménou (ARD), jež sestává ze 17 ankyrinových repetic (AR) a oblasti propojující ARD s prvním transmembránovým helixem^{3,4}. Pět ankyrinových repetic obsahuje přísně konzervovaný tetrapeptidový T/SPLH motiv, v němž první α -helix začíná prolinem a threonin s histidinem tvoří vodíkové můstky uvnitř repetice a mezi repeticemi, čímž přispívají k lokální konformační stabilitě ankyrinové repetice^{6,7}. Základním předpokladem této studie bylo, že přísná konzervovanost T/SPLH motivů v ankyrinových repeticích AR2, AR6, AR11-AR13 napříč živočišnými druhy a přesná stabilita těchto N-terminálních repetic je nezbytná pro správnou funkci TRPA1 kanálu. Byla vytvořena série mutantních konstruktů uvnitř T/SPLH motivů nebo v sousedních ankyrinových repeticích s cílem stabilizovat (vnesením GxT/SPLH motivu do sousední AR) nebo destabilizovat (záměnou threoninu/serinu za alanin či aspartát) konformaci ankyrinové repetice obsahující motiv T/SPLH.

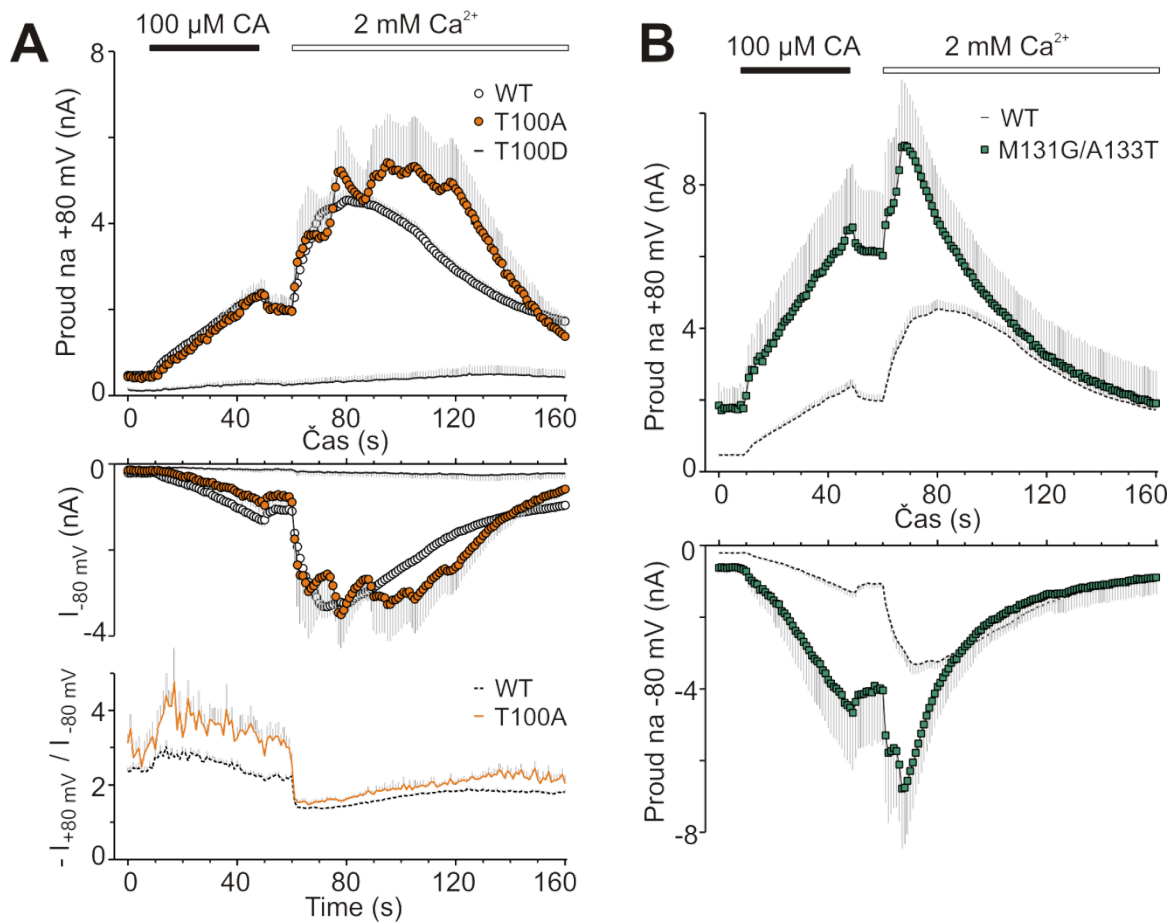
Stabilizací či destabilizací konsensuálního motivu T/SPLH překvapivě došlo k vytvoření velmi rozličných fenotypů závisle na tom, kde přesně v N-konci se AR obsahující konsensuální motiv nachází. Mutacemi v T/SPLH motivech zároveň došlo ke změnám citlivosti vůči různým aktivačním podnětům opět v závislosti na umístění příslušné AR v N-konci.

U mutace T100A v AR2 bylo pozorováno snížení bazální vodivosti na záporných membránových potenciálech, jež je známkou porušení rovnováhy otevřeného a zavřeného stavu kanálu ve prospěch zavřeného stavu. Naproti tomu dvojmutace M131G/A133T v AR3 byla konstitutivně aktivována; kanál vykazoval napětově-nezávislou aktivaci na záporných membránových potenciálech, což naznačuje snížení energie potřebné pro otvírání póru (Obr. 2A a 2B). Během aplikace skořicového aldehydu byly proudové odpovědi mutantu T100A na +80 mV srovnatelné s odpověďmi divokého typu, zatímco na záporných membránových potenciálech byly signifikantně sníženy. Proudové odpovědi na agonistu byly u dvojmutantu M131G/A133T naopak výrazně zvýšeny na obou membránových potenciálech. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že druhá ankyrinová repetice AR2 přispívá k napětově závislému vrátkování TRPA1 kanálu.

Destabilizujícími mutacemi threoninu T241 v AR6 (T241A a T241D) vznikly fenotypy se zachovanou citlivostí ke všem testovaným podnětům, lze se tedy domnívat, že přísná konzervovanost TPLH motivu v AR6 není nezbytná pro správnou funkci TRPA1. Pro další prozkoumání funkční úlohy TPLH motivu v šesté ankyrinové repetici byly vytvořeny další dvě mutace. První z nich, K239G, byla předpovězena úloha ve stabilizaci šesté ankyrinové repetice tím, že dojde ke kompaktnějšímu uspořádání AR do tvaru „L“. Druhý mutant H244R měl destabilizovat AR6 snížením její mechanické stability¹⁷. Obě mutace vykazovaly nižší proudové odpovědi na depolarizující napětí i na chemické aktivátory. Tento fenotyp byl překvapivý zvláště u mutace K239G, jež odpovídá konsensuálnímu glycinu dvě rezidua před TPLH motivem. Ke změně funkce této mutace nejspíše přispělo porušení důležitých interakcí v oblasti kličky, která předchází AR6.

Získané výsledky naznačují, že ankyrinové repetice AR2 a AR6 přispívají k napětově závislému vrátkování kanálu, přestože se nacházejí v N-konci značně vzdáleném od transmembránové oblasti. Nedávno vyřešená struktura TRPA1 přinesla mechanistické vysvětlení, jak může komunikovat proximální část ankyrinové domény s vrátky kanálu:

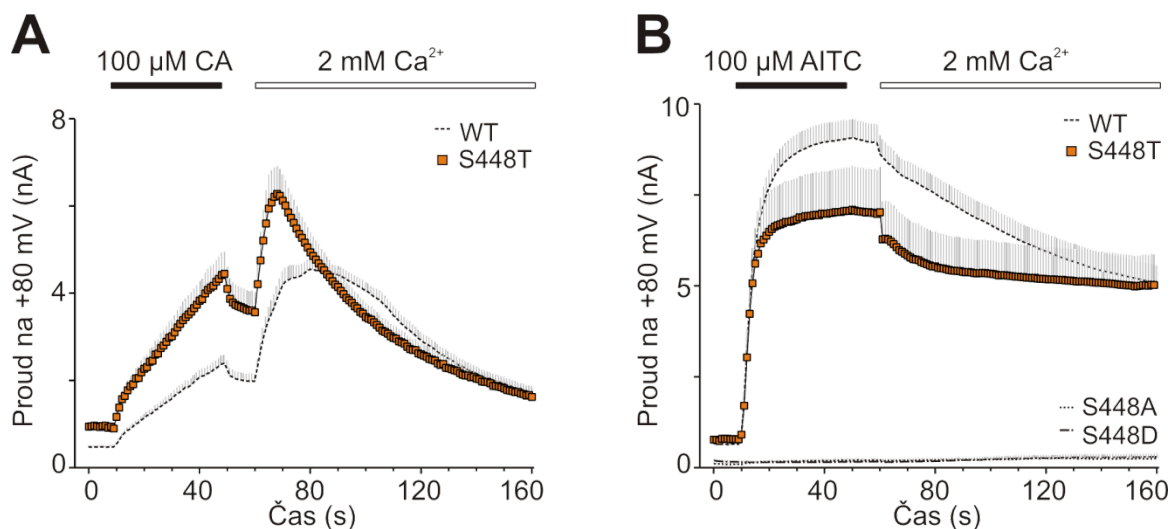
informace z ARD může být převedena pomocí motivu helix-otočka-helix v oblasti, která spojuje ARD s prvním transmembránovým helixem a jež dále vytváří síť interakcí s „TRP-like“ doménou.



Obrázek 2. Mutace ovlivňující konformační stabilitu ankyrinových repetič 2 a 3 způsobují změnu napěťově-závislého vrátkování TRPA1 kanálu. (A a B) Časový záznam průměrné proudové odpovědi divokého typu a mutantních receptorů TRPA1 měřené na -80 mV a +80 mV. Aplikace 100 μM skořicového aldehydu (CA) a přidání roztoku 2 mM vápenatých iontů jsou vyznačeny nad záznamem. Nižší, průměrná rektifikace výše uvedených proudů.

Obě mutace serinu S448 (S448A a S448D) v AR12 překvapivě ztratily citlivost na všechny testované podněty. Byla vyslovena hypotéza, že pokud S448 podstatně přispívá ke stabilitě ARD tvorbou vodíkových můstků uvnitř ankyrinové repetice a mezi repeticemi navzájem, potom by mohl threonin na stejné pozici pomoci zlepšit vzájemné interakce reziduí ve své bezprostřední blízkosti zvýšenou hydrofobicitou díky přítomnosti methylové skupiny v postranním řetězci⁶. Překvapivým zjištěním bylo, že mutace S448T vykazovala patrné rozdíly mezi charakteristickými proudy vyvolanými agonisty skořicovým aldehydem (CA) a allyl isothiokyanátem (AITC). Zatímco proudy vyvolané 100 μM CA byly významně větší a po přidání 2 mM Ca^{2+} do extracelulárního roztoku dosahovaly asi 1,4 krát vyšší amplitudy než divoký typ receptoru (WT) při zachování kinetiky Ca^{2+} -desenzitizace, proudy vyvolané plným agonistou AITC (100 μM) byly naopak nižší než u WT a desenzitizace vápenatými ionty byla u mutace výrazně slabší (Obr. 3).

I přesto, že je serin v T/SPLH tetrapeptidech statisticky třikrát méně upřednostňovaný než threonin, role S448 v TRPA1 se jeví specifická a pravděpodobně je evolučně podmíněná. Protože se míra exprese mutace S448T významně nelišila od divokého typu, lze předpokládat, že konstitutivní aktivita mutace má vliv na přechod mezi otevřeným a zavřeným stavem kanálu napětově nezávislým způsobem.



Obrázek 3. Přísná konzervovanost SPLH motivu v AR12 je nezbytná pro funkční interakce. (A a B) Časový záznam průměrné proudové odpovědi divokého typu a mutantních receptorů TRPA1 měřené na +80 mV. Aplikace 100 μM skořicového aldehydu (CA, (A)) nebo 100 μM allyl isothiokyanátu (AITC, (B)) a následně přidání roztoku 2 mM vápenatých iontů jsou vyznačeny nad záznamem. Všimněte si, že mutant S448T vykazuje větší proudové odpovědi v přítomnosti CA, ale nižší v AITC. Mutace S448A a S448D jsou necitlivé na AITC.

4.2 Role konzervovaných T/SPLH motivů ve fosforylaci TRPA1

Konzervované motivy T/SPLH mohou, kromě role v konformační stabilitě ankyrinových repetič, hrát úlohu fosforylačních míst pro Ser/Thr kinázy rozpoznávající prolin. Jedním z těchto enzymů je cyklin-dependentní kináza 5 (Cdk5), jež je přítomna v neuronech a hraje důležitou roli v nociceptivní signalizaci modifikací threoninu na N-konci příbuzného vaniloidního receptoru TRPV1¹⁹.

Pro ověření hypotézy, zda může být i TRPA1 modulován Cdk5, byl receptor exprimován společně s kinázou a jejím aktivátorem p35. Expres TRPA1 s aktivátorem p35 samotným a s kombinací p35 a Cdk5 vedla k významnému zvýšení proudových odpovědí vyvolaných skořicovým aldehydem, což naznačuje, že TRPA1 je možným substrátem pro komplex Cdk5/p35 a/nebo interakce receptoru s proteinem p35 stabilizuje aktivovaný stav iontového kanálu.

Bioinformatickou analýzou primární sekvence TRPA1 byly predikovány threoniny T100, T241, T415, T484 a serin S448 jako možná fosforylační místa pro Cdk5 s vysokou pravděpodobností. Získaná data však naznačují, že uvedená rezidua spíše nehrají roli ve fosforylaci TRPA1, neboť nefosforylovatelná mutace za alanin a fosfomimikující mutace za aspartát nevedly k protichůdným změnám funkce kanálu.

Následná sekvenční analýza odhalila další tři možná fosforylační místa pro Cdk5, serinová rezidua S344, S616 a threonin T673. Pro doplnění celkové představy o roli všech N-terminálních T/SP motivů byla rovněž tato rezidua mutována za alanin

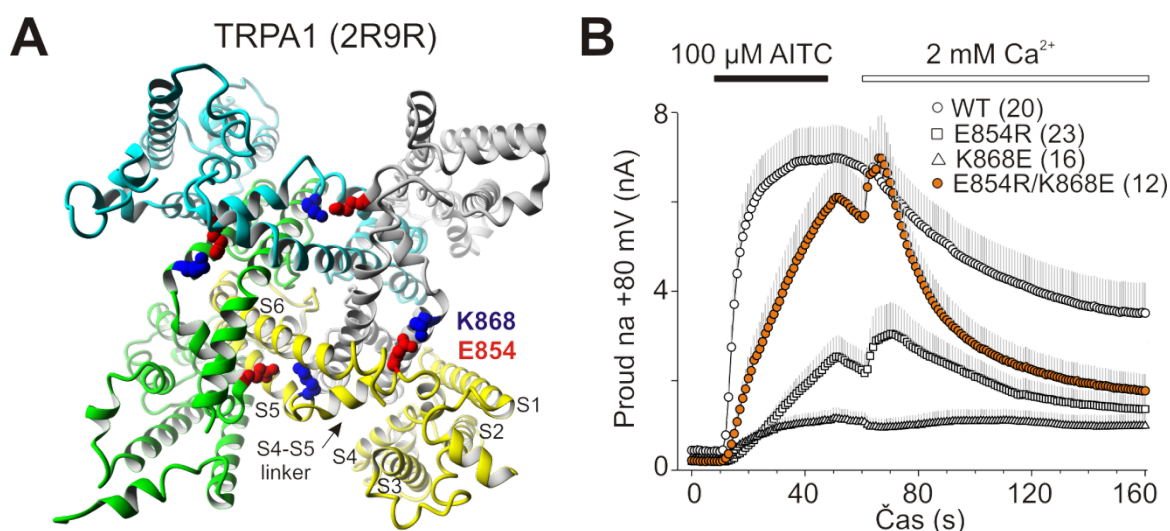
a aspartát. Mezi nově vytvořenými konstrukty vykazovala pouze mutace T673D téměř trojnásobné proudové odpovědi ve srovnání s divokým typem receptoru. Podle publikovaného strukturního modelu TRPA1 se reziduum T673 nachází v oblasti, jež je flexibilní a přístupná rozpouštědlům, což naznačuje jeho možnou úlohu potenciálního fosforylačního místa.

4.3 Strukturální podstata dědičného bolestivého syndromu

Druhá studie, jež je součástí předkládané disertační práce, byla motivována předchozím objevem konstitutivně aktivované mutace N855S v S4-S5 oblasti TRPA1, která je příčinou onemocnění familiálního epizodického bolestivého syndromu¹⁴. Pro prozkoumání strukturální podstaty této kanálopatie bylo využito homologní modelování, molekulárně dynamické simulace a elektrofyziologická technika terčíkového zámku v konfiguraci snímání z celé buňky.

Homologní model transmembránové oblasti TRPA1 byl vytvořen na templátu struktury chiméry napětím aktivovaných draselných kanálů Kv1.2/2.1 (pdb kód 2R9R). V tomto modelu byla objevena interakce mezi polárními rezidui glutamátem E854, jenž se nachází v S4-S5 oblasti jedné podjednotky v těsné blízkosti N855, a lysinem K868 v pátém transmembránovém helixu sousední podjednotky. Na základě tohoto zjištění byla vyslovena hypotéza, že funkční změny způsobené mutací N855S mohly být, alespoň do jisté míry, způsobeny porušením této interakce mezi podjednotkami (Obr. 4A).

Možný vliv predikované interakce mezi podjednotkami na funkční vlastnosti TRPA1 byl experimentálně ověřen pomocí elektrofyziologických snímání z celé buňky. Pro zjištění, zda jsou specifické interakce mezi nabitými rezidui nezbytné pro správnou funkci iontového kanálu, byly vytvořeny mutace nabitých aminokyselin za neutrální alanin (E854A a K868A) a za aminokyseliny s opačným nábojem (E854R a K868E). Dále byla vytvořena dvojmutace E854R/K868E pro zjištění, zda by mohl dvojmutant navrátit funkci TRPA1 kanálu.



Obrázek 4. (A) Intracelulární pohled homologního modelu TRPA1 kanálu podle chiméry napětově řízených draselných kanálů Kv1.2/2.1 s vyznačenými rezidui E854 a K868. (B) Časový záznam průměrné proudové odpovědi divokého typu a mutantních receptorů TRPA1 měřené na +80 mV. Aplikace 100 μM allyl isothiokyanátu (AITC) a následné přidání roztoku 2 mM vápenatých iontů jsou vyznačeny nad záznamem.

Ze získaných dat vyplývá, že mutace reziduí E854 a K868 vedou ke změnám v kinetice vrátkování kanálu. Mutace na pozici K868 destabilizují zavřenou, klidovou konformaci kanálu a silně snižují odpovědi na všechny testované podněty (depolarizující napětí, AITC). Mutace E854A a E854R byly citlivé na agonistu AITC, ale jejich odpovědi na depolarizující napěťové skoky měly menší amplitudu než v případě divokého typu receptoru. Dvojmutace s opačnými náboji E854R/K868E obnovila normální zavírání kanálu na hyperpolarizačních membránových potenciálech, přestože neměla zachovanou normální napěťovou závislost. Maximální odpověď dvojmutantu na agonistu AITC však nebyla signifikantně pozměněná oproti divokému typu, přestože nástup AITC-vyvolané odpovědi byl zjevně pomalejší (Obr. 4B). Zjištění, že dvojmutací za opačně nabitá rezidua dojde k částečnému navrácení funkce TRPA1, podporuje hypotézu prostorové blízkosti reziduí E854 a K868.

Výsledky experimentů naznačují, že zvýšená aktivace na záporných potenciálech a pozměněná citlivost mutace N855S k vápenatým iontům mohla být způsobena blízkostí asparaginu N855 k reziduí E854 a K868, jež se účastní alosterické modulace a napěťové citlivosti receptoru. Selektivní porušení napěťově závislého vrátkování u dvojmutace E854R/K868E navíc naznačuje, že tato rezidua mohou být součástí napěťově citlivé domény TRPA1 receptoru.

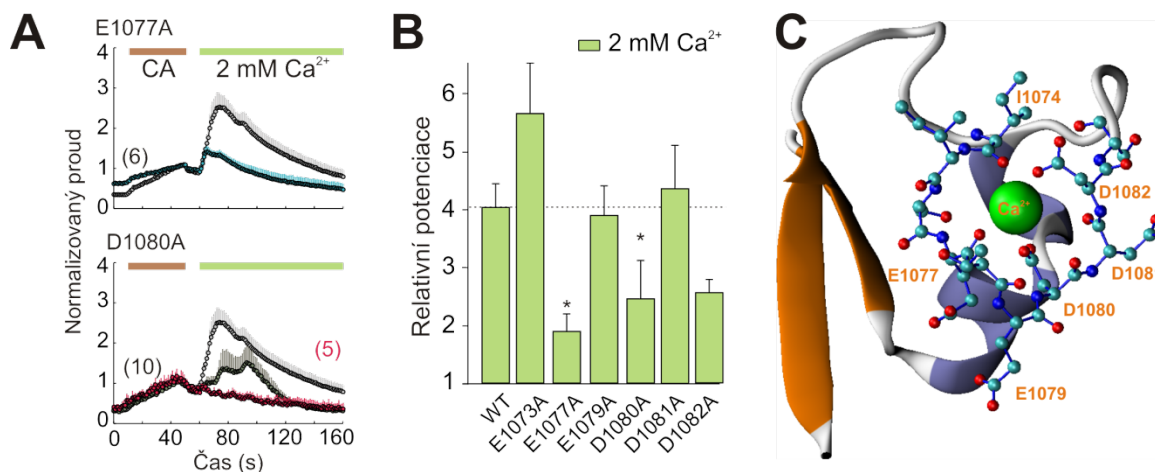
4.4 C-koncový klastr kyselých aminokyselin se podílí na modulaci lidského TRPA1 receptoru vápenatými ionty

K nejvýznamnějším fyziologickým modulátorům TRPA1 patří vápenaté ionty, přesné molekulární mechanismy Ca^{2+} -závislé potenciace a inaktivace však prozatím zůstávají do značné míry neobjasněny.

Roli vazebné domény pro vápenaté ionty mohou hrát kyselá rezidua na cytoplasmatické straně TRPA1. Vysoce evolučně konzervovaná sekvence kyselých aminokyselin na C-konci receptoru, $^{1077}\text{ETEDDD}^{1082}$, je sekvenčně podobná tzv. “ Ca^{2+} bowl” doméně draselných BK kanálů²⁰. Možný vliv $^{1077}\text{ETEDDD}^{1082}$ motivu na Ca^{2+} -modulaci TRPA1 byl studován pomocí cílené mutagenese, elektrofyziologických technik, homologního modelování a molekulárně-dynamických simulací.

Nejprve byla všechna kyselá rezidua postupně mutována za neutrální alanin. Žádný z mutantů kromě E1077A nevykazoval výrazně sníženou citlivost na skořicový aldehyd ve srovnání s divokým typem receptoru, ale kinetiku Ca^{2+} -vyvolané potenciace měly pozměněnou hned čtyři mutace ze šesti: E1073A, D1080A, D1081A a D1082A (Obr. 5A a 5B).

Tyto výsledky naznačují, že celý klastr kyselých aminokyselin je strukturálně důležitý a ovlivňuje modulaci TRPA1 vápenatými ionty. Pro prokázání schopnosti kyselé oblasti vázat Ca^{2+} byly dále provedeny molekulárně dynamické simulace za použití lidského BK kanálu jako templátového proteinu (pdb kód 3MT5). Po nahrazení deseti reziduí templátu $^{889}\text{QFLDQDDDD}^{898}$ ve struktuře Ca^{2+} vazebné domény BK proteinu motivem $^{1074}\text{I ISETEDDD}^{1083}$ z TRPA1 bylo po provedení molekulárně dynamických simulací prokázáno, že tento úsek je schopen vázat vápenaté ionty. Dále bylo zjištěno, že dvě rezidua D1080 a D1082 jsou v přímém kontaktu s Ca^{2+} prostřednictvím kyslíku svého postranního řetězce, což je v souladu se získanými elektrofyziologickými daty (Obr. 5C).

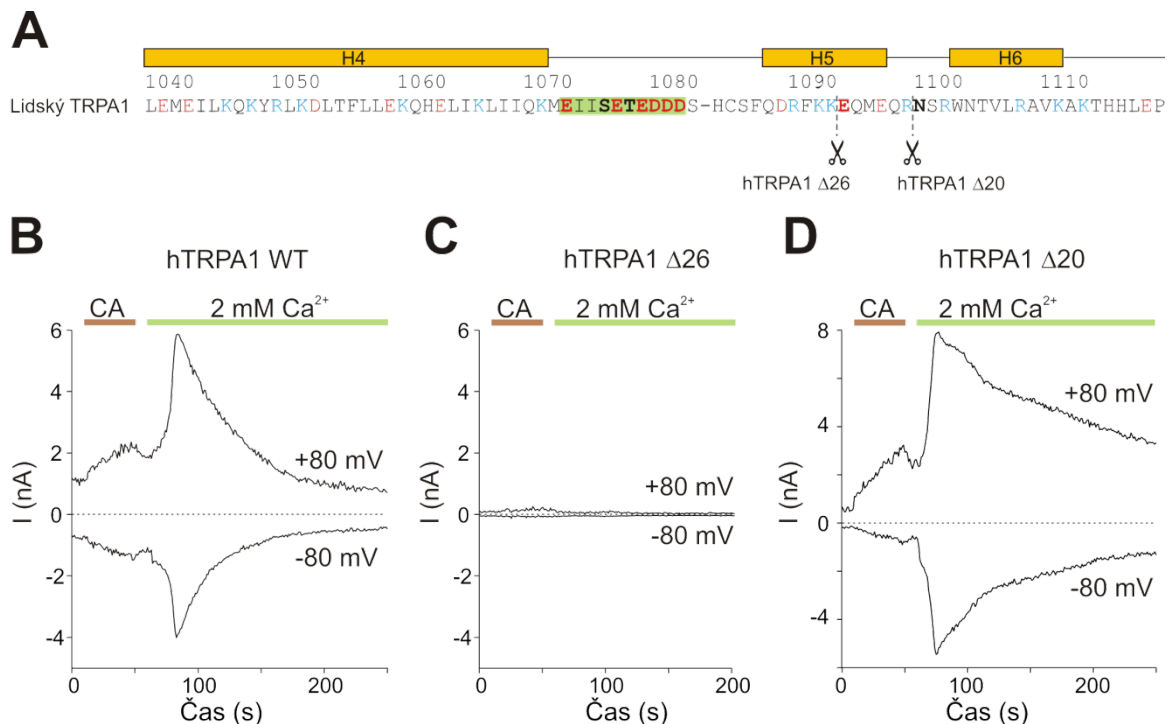


Obrázek 5. Motiv ¹⁰⁷⁴I ISETEDDDS¹⁰⁸³ ovlivňuje modulaci lidského TRPA1 receptoru vápenatými ionty. (A) Časový záznam průměrné proudové odpovědi divokého typu a mutantních receptorů TRPA1 měřené na +80 mV. Aplikace 100 μM skořicového aldehydu (CA) a přidání roztoku 2 mM vápenatých iontů jsou vyznačeny nad záznamem. Proudů jsou normalizovány na jejich maximální CA odpovědi odečtené před přidáním Ca²⁺ do extracelulárního roztoku. Záznam nepotencovaných proudů mutantu D1080A (červeně) je umístěn před průměrným záznamem ze všech buněk. (B) Potenciace odpovědi na skořicový aldehyd vynesena jako nárůst amplitud proudových odpovědí indukovaný roztokem 2 mM Ca²⁺ na +80 mV. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami pro divoký a mutantní typ receptoru. (C) Model vazebného místa pro Ca²⁺ v hSlo1-TRPA1 chiméře. Aminokyselinová rezidua z TRPA1 jsou zobrazena jako kuličkový model.

4.5 Funkční úloha distálního C-konce lidského TRPA1

Pro zjištění funkční role distálního karboxylového konce lidského TRPA1 receptoru byly vytvořeny zkrácené mutantní konstrukty TRPA1-Δ20 a TRPA1-Δ26. V mutantu TRPA1-Δ20 byl odstraněn poslední predikovaný helix (H6) na C-konci vnesením stop kodonu na pozici 1100, mutace TRPA1-Δ26 vznikla vnesením stop kodonu na pozici 1094, čímž došlo ke zkrácení pátého predikovaného helixu H5 a zároveň k zachování struktury Ca²⁺ vazebného motivu ¹⁰⁷⁴I ISETEDDDS¹⁰⁸³.

Mutací TRPA1-Δ26 došlo ke ztrátě citlivosti konstruktů ke všem testovaným podnětům, což ukazuje na funkční důležitost pátého predikovaného helixu. Zkrácený konstrukt TRPA1-Δ20 zůstal funkční, ale oproti divokému typu receptoru vykazoval výrazně pomalejší inaktivaci v přítomnosti 2 mM vápenatých iontů při zachování stejné míry Ca²⁺ potenciace a citlivosti na skořicový aldehyd a na depolarizační napětí jako WT. Touto sérií experimentů byl potvrzen význam distálního C-konce TRPA1 jako nezbytné součásti Ca²⁺-závislého inaktivačního mechanismu.



Obrázek 6. Zkrácení C-konce odhalilo oblast, jež se účastní Ca^{2+} - závislé inaktivace. (A) Aminokyselinová sekvence distálního C-konce. Predikovaná sekundární struktura je uvedena nad sekvencí. Aminokyseliny mutované v této studii jsou vyznačeny tučně. **(B)** Časový záznam reprezentativní proudové odpovědi divokého typu TRPA1 měřené na -80 mV a $+80$ mV. Aplikace $100 \mu\text{M}$ skořicového aldehydu (CA) a přidání roztoku 2 mM vápenatých iontů jsou vyznačeny nad záznamem. **(C a D)** Rampový protokol pro zkrácené mutace. Všimněte si výrazně pomalejší inaktivace zkrácené mutace TRPA1- $\Delta 20$ po přidání 2 mM Ca^{2+} ve srovnání s divokým typem receptoru.

5. Závěry

- Nejvíce konzervované N-koncové konsenzuální tetrapeptidové T/SPLH motivy, které se nacházejí na začátku ankyrinových repetič AR2, AR6, AR11, AR12 a AR13, jsou nezbytné pro správnou funkci TRPA1 a významně přispívají k jeho multimodální aktivaci.
- Stabilizující mutace v AR2 a v sousední AR3 ovlivňují napětově závislé vrátkování TRPA1 kanálu. Přísná konzervovanost T/SPLH motivů v AR11-AR13 je nezbytná pro funkční interakce, ale ne pro cílení TRPA1 proteinu do plasmatické membrány.
- Konzervované T/SPLH motivy nejspíše nehrají roli fosforylačních míst pro Cdk5. Jediné reziduum splňující podmínku konsenzuální sekvence pro Cdk5 a nárůstu citlivosti receptoru vůči testovaným podnětům při fosfomimikujících podmínkách je threonin T673, jenž se nachází mimo ARD.
- Homologní modelování a molekulárně-dynamické simulace odhalily solný můstek mezi rezidui E854 v S4-S5 oblasti jedné receptorové podjednotky a K868 v S5

helixu vedlejší podjednotky. Zvýšená aktivace a změna citlivosti k vápenatým iontům mutantu N855S, jenž je příčinou familiálního epizodického bolestivého syndromu, jsou pravděpodobně způsobeny narušením této interakce.

- Klastř kyselých aminokyselin E1077 - D1082 v distálním C-konci přispívá k Ca²⁺- modulaci TRPA1 a je možným vazebným místem pro vápenaté ionty.
- Úsek posledních dvaceti C-koncových aminokyselin je nezbytný pro plnou inaktivaci TRPA1 receptoru vyvolanou vápenatými ionty.

6. Použitá literatura

1. Nilius, B. & Flockerzi, V. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. Volume II. Handbook of Experimental Pharmacology* **223**, (2014).
2. Vannier, B., Zhu, X., Brown, D. & Birnbaumer, L. The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J. Biol. Chem.* **273**, 8675–8679 (1998).
3. Paulsen, C. E., Armache, J., Gao, Y., Cheng, Y. & Julius, D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **520**, 511–517 (2015).
4. Cvetkov, T. L., Huynh, K. W., Cohen, M. R. & Moiseenkova-Bell, V. Y. Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **286**, 38168–38176 (2011).
5. Brewster, M. S. J. & Gaudet, R. How the TRPA1 receptor transmits painful stimuli: Inner workings revealed by electron cryomicroscopy. *BioEssays* **37**, 1184–1192 (2015).
6. Guo, Y. *et al.* Contributions of conserved TPLH tetrapeptides to the conformational stability of ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **399**, 168–181 (2010).
7. Yuan, C. *et al.* The study of pH-dependent stability shows that the TPLH-mediated hydrogen-bonding network is important for the conformation and stability of human gankyrin. *Biochemistry* **52**, 4848–4857 (2013).
8. Bandell, M. *et al.* Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849–857 (2004).
9. Jordt, S.-E. *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260–265 (2004).
10. Cavanaugh, E. J., Simkin, D. & Kim, D. Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca²⁺ reveals different functional channel states. *Neuroscience* **154**, 1467–1476 (2008).
11. Karashima, Y. *et al.* Agonist-induced changes in Ca²⁺ permeation through the nociceptor cation channel TRPA1. *Biophys. J.* **98**, 773–783 (2010).
12. Nilius, B., Prenen, J. & Owsianik, G. Irritating channels: the case of TRPA1. *J. Physiol.* **589**, 1543–1549 (2011).
13. Wang, Y. Y., Chang, R. B., Waters, H. N., McKemy, D. D. & Liman, E. R. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J. Biol. Chem.* **283**, 32691–32703 (2008).
14. Kremeyer, B. *et al.* A Gain-of-Function Mutation in TRPA1 Causes Familial Episodic Pain Syndrome. *Neuron* **66**, 671–680 (2010).

15. Binder, A. *et al.* Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS One* **6**, (2011).
16. Dittert, I. *et al.* Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J. Neurosci. Methods* **151**, 178–185 (2006).
17. Lee, W., Strumpfer, J., Bennett, V., Schulten, K. & Marszalek, P. E. Mutation of conserved histidines alters tertiary structure and nanomechanics of consensus ankyrin repeats. *J. Biol. Chem.* **287**, 19115–19121 (2012).
18. Cordero-Morales, J. F., Gracheva, E. O. & Julius, D. PNAS Plus: Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, E1184–E1191 (2011).
19. Liu, J., Du, J., Yang, Y. & Wang, Y. Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Exp. Neurol.* **273**, 253–262 (2015).
20. Yuan, P., Leonetti, M. D., Pico, A., Hsiung, Y. & MacKinnon, R. Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science* **329**, 182–6 (2010).

Strukturovaný životopis

Mgr. Anna Kádková (rozená Hynková)

Narozena 30. 5. 1988 v Praze

E-mail: anna.kadkova@gmail.com

Vzdělání

2012 – současnost Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, studijní obor Biochemie, doktorské studium, disertační práce *Studium funkce a struktury teplotně aktivovaných TRP iontových kanálů: Role evolučně konzervovaných motivů v modulaci TRPA1*

2010 – 2012 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, studijní obor Biochemie, navazující magisterské studium, diplomová práce *Modulace ankyrinového receptoru TRPA1 divalentními kationty*

2007 – 2010 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, studijní obor Biochemie, bakalářské studium, bakalářská práce *Vazba organických barviv na proteiny. Možnosti využití v rámci praktika z biochemie.*

Jazykové znalosti

Anglický jazyk – pokročilá znalost, zkouška FCE

Německý jazyk – pokročilá znalost, zkouška Goethe-Zertifikat B2

Odborné kurzy

2014 Odborná způsobilost pro VŠ pracovníky k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání

2015 Kurz Management vědy a inovací

Odborná praxe

2011 – současnost Práce v laboratoři RNDr. Viktorie Vlachové, DrSc.; používané metody: práce s tkáňovými kulturami a transfekce, molekulárně-biologické techniky (PCR, transformace bakterií), elektrofyziologická technika patch clamp, biochemické techniky (SDS elektroforéza, Western Blot)

2015 Stáž na University of Leeds v laboratoři prof. Nikity Gampera, PhD.; používané metody: disekce, kultivace a transfekce DRG a TG neuronů, Ca²⁺ imaging

Pedagogická činnost

Kurz Základy receptorové neurofyziologie (praktická cvičení a přednášky)

Molekulární podstata buněčné dráždivosti (praktická cvičení)

Školení studentů v elektrofyziologických technikách (Jana Vašková, Viktor Synytsya, Katja Witschas)

Udělené granty a ocenění

2014 Cena za nejlepší prezentaci „Advancement Report“, Fyziologický ústav AV ČR

2013 Grantová Agentury Univerzity Karlovy v Praze, grant č. 888513 „Funkční úloha S4-S5 oblasti ankyrinového receptoru TRPA1“

Seznam publikací

- 1) **Hynkova A.**, Marsakova L., Vaskova J., Vlachova V.
N-terminal tetrapeptide T/SPLH motifs contribute to multimodal activation of human TRPA1 channel
Scientific Reports, 6:28700, 2016
- 2) Zima V., Witschas K., **Hynkova A.**, Zimova L., Barvik I., Vlachova V.
Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveals inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state.
Neuropharmacology, 93: 294-307, 2015
- 3) Sura L., Zima V., Marsakova L., **Hynkova A.**, Barvik I., Vlachova V.
C-terminal acidic cluster is involved in Ca²⁺-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel.
The Journal of Biological Chemistry, 287(22):18067-77, 2012
- 4) Boukalova S., Touska F., Marsakova L., **Hynkova A.**, Sura L., Chvojka S., Dittert I., Vlachova V.
Gain-of-function mutations in the transient receptor potential channels TRPV1 and TRPA1: how painful?
Physiological Research, 63 Suppl 1:S205-13, 2014