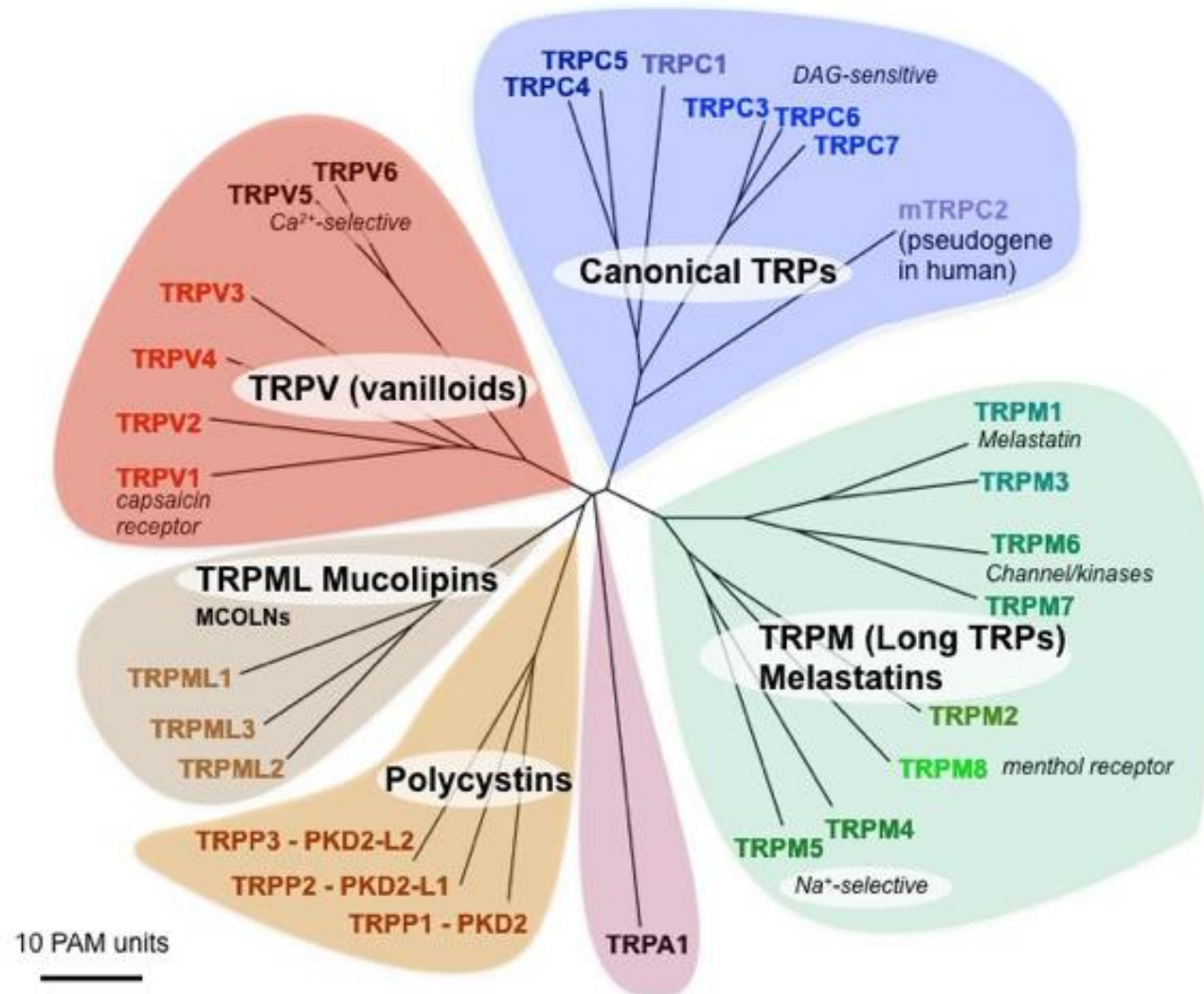


TRP channels: a brief overview



Transient Receptor Potential Channels

- ✓ Transient receptor potential (TRP) proteins are a large group of ion channels that control many physiological functions in our body.
- ✓ TRPs are widespread in eukaryotes, from yeast to mammals.
- ✓ They are characterized by remarkable diversity in ionic selectivity and activation mechanisms.
- ✓ They are sensitive to a wide range of chemical and physical stimuli.
- ✓ Importantly, they have many functional roles in both excitable and non-excitable cells, some of which are still to be completely elucidated.
- ✓ These channels are considered potential therapeutic drug targets for various diseases such as neurological disorders, cancers, cardiovascular disease, and many more.

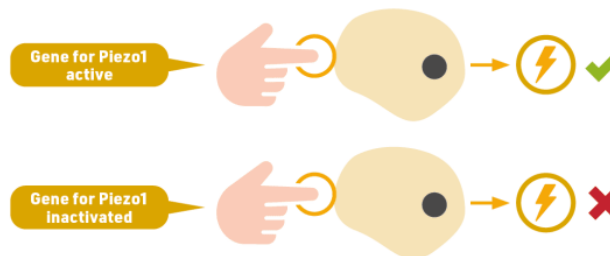
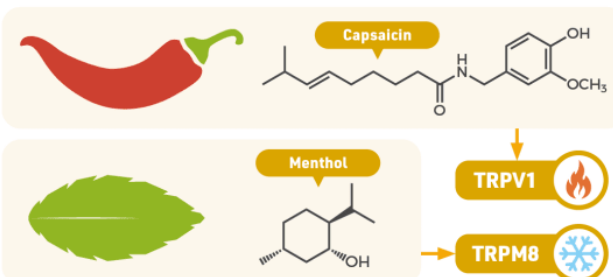
2021 NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY/MEDICINE



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021 was awarded jointly to **David Julius** and **Ardem Patapoutian** for their discoveries of several receptors for temperature and touch.



How do our bodies sense changes in temperature, and what lets us know when we're touching something? The winners of this year's prize identified how nerve impulses that pass on this information are triggered by changes in temperature or pressure, allowing our bodies to sense our environment.



David Julius identified a gene that made cells sensitive to capsaicin, the spicy compound in chilli peppers. This gene codes for the TRPV1 receptor, an ion channel activated by temperatures above 43 °C. Other temperature-sensing ion channels were discovered, including TRPM8 which is activated by cold temperatures and was identified using menthol, the cooling compound found in mint.

Ardem Patapoutian used cells which gave off a measurable electric signal when prodded to identify a gene which, when inactivated, stopped this signal. The gene codes for the Piezo1 receptor, a mechanosensitive ion channel. A similar channel, Piezo2, is essential for the sense of touch. Both receptors also have roles in regulation of blood pressure, respiration, and bladder control.



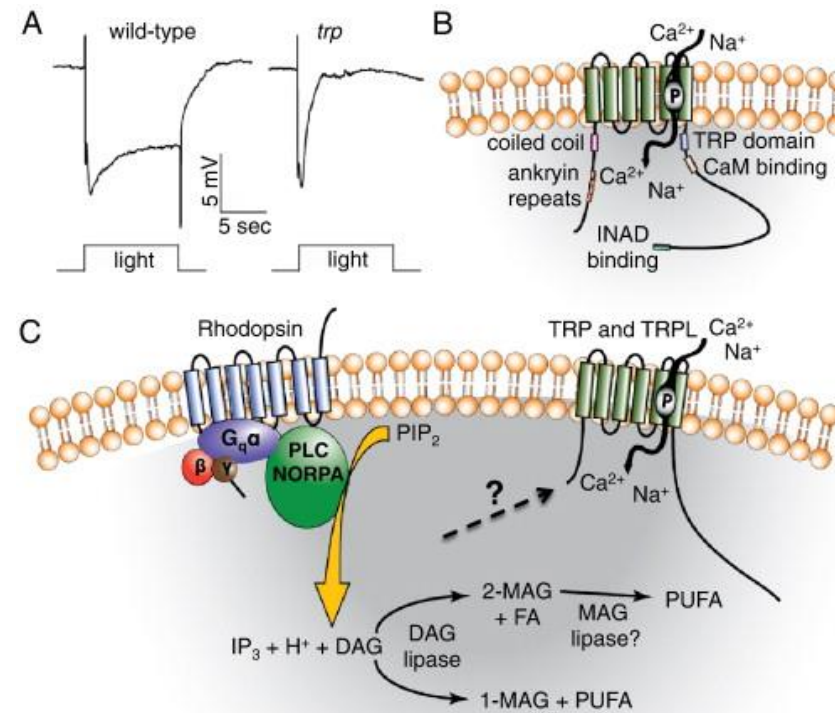
WHY DOES THIS RESEARCH MATTER?

This research explains some of the ways in which we sense our environment. Understanding how our bodies sense changes in temperature and pressure has also helped with the development of treatment for pain, some cancers, and asthma.

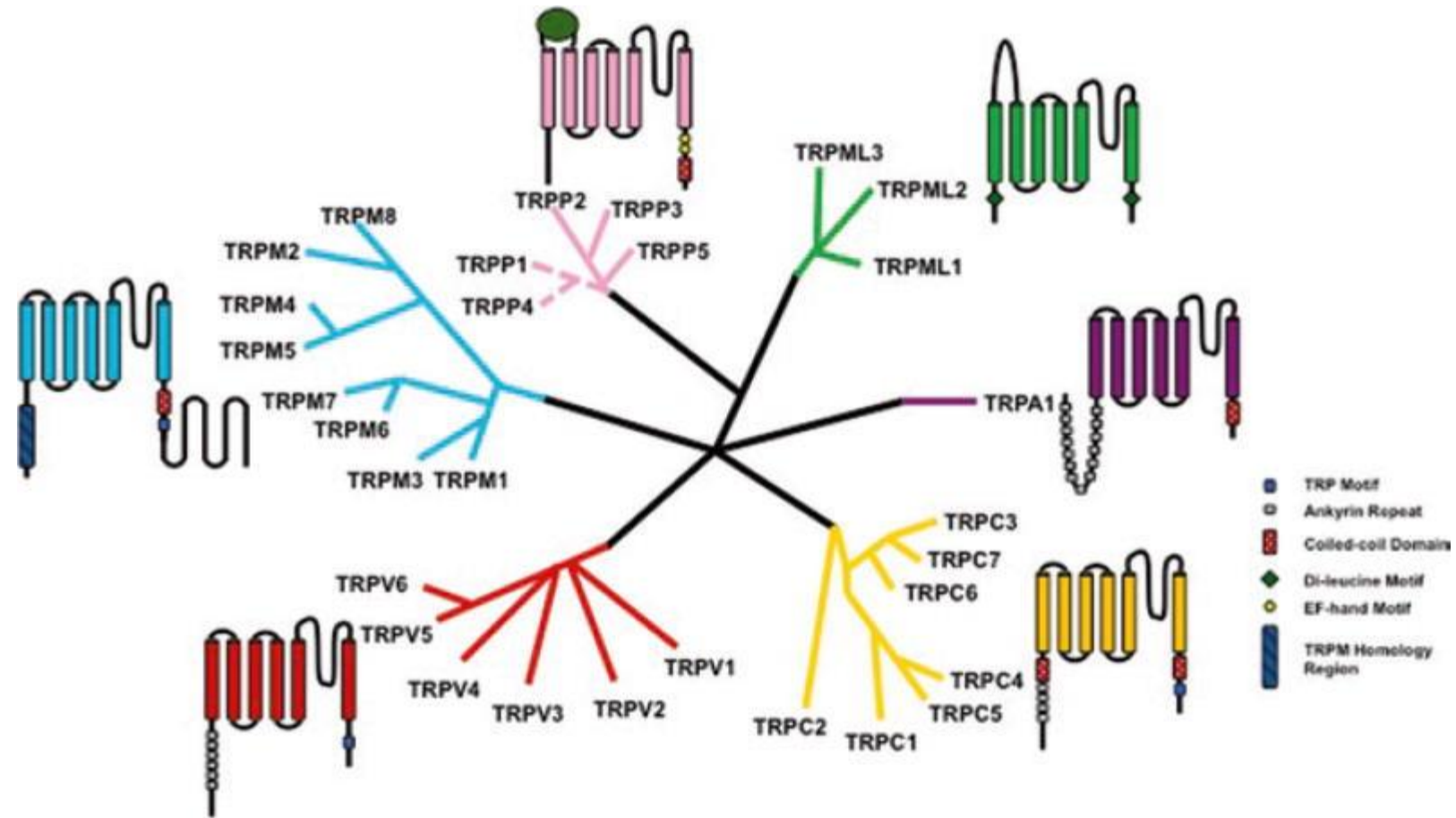
Nobel Prize in Physiology or Medicine Press release: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2021/press-release/>



One of the earliest *Drosophila* mutations affecting the behavioral response to visual cues during flight was originally referred to as the *A*-type mutation (Cosens and Perry, 1972). These flies are behaviorally impaired since they display only a transient rather than a sustained response to bright light (Cosens and Manning, 1969). However, if it were a channel, the type of channel was unclear since light-induced quantum bumps were still present in the mutant flies. The subsequent observation that Ca^{2+} influx was reduced in the mutant animals in response to light stimulation (Hardie and Minke, 1992) suggested that TRP might be a Ca^{2+} permeable channel required for the light response. On the basis of this electrophysiological phenotype the mutation was subsequently re-named *trp* for *transient receptor potential*.



TRP channel superfamily



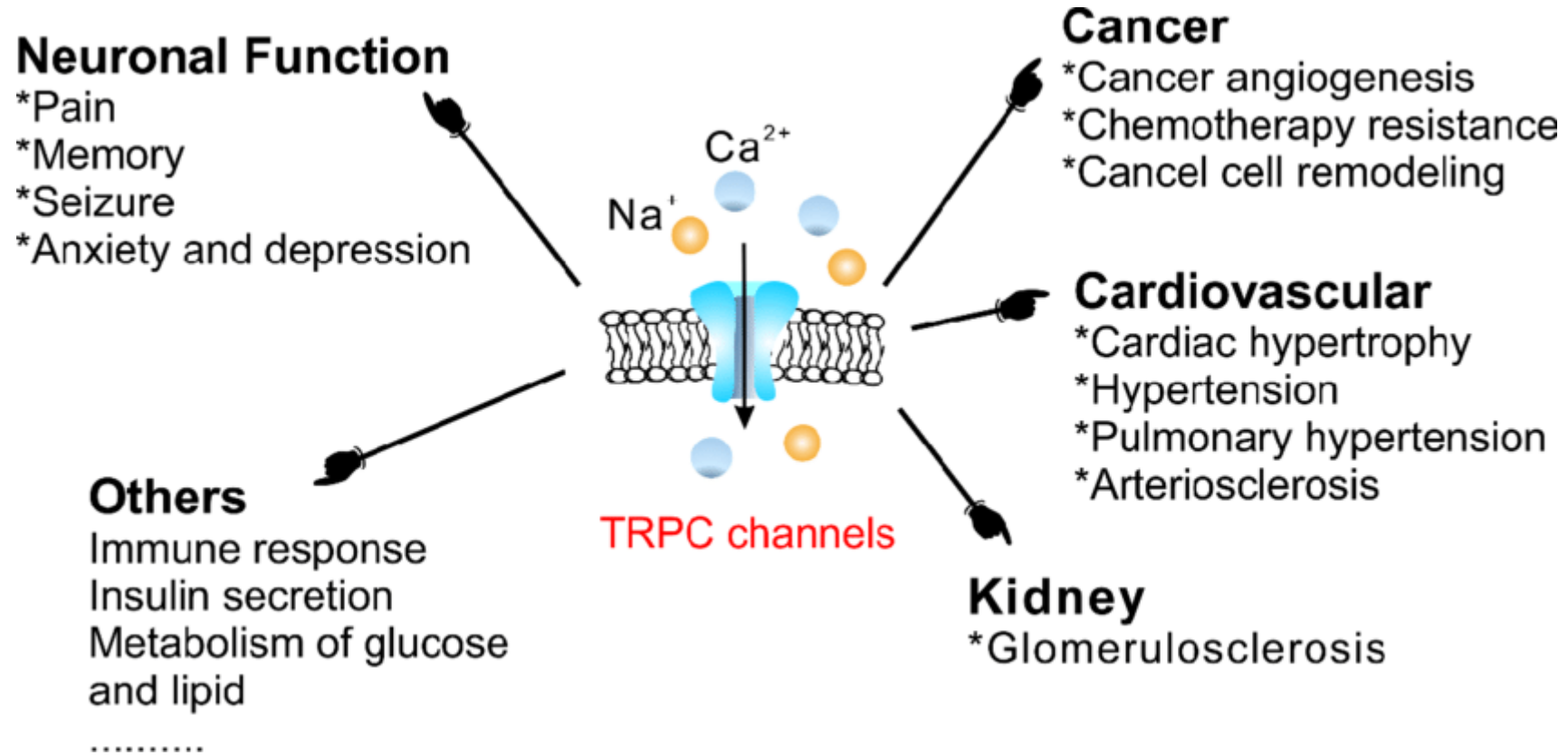
Activation of TRP channels is typically polymodal

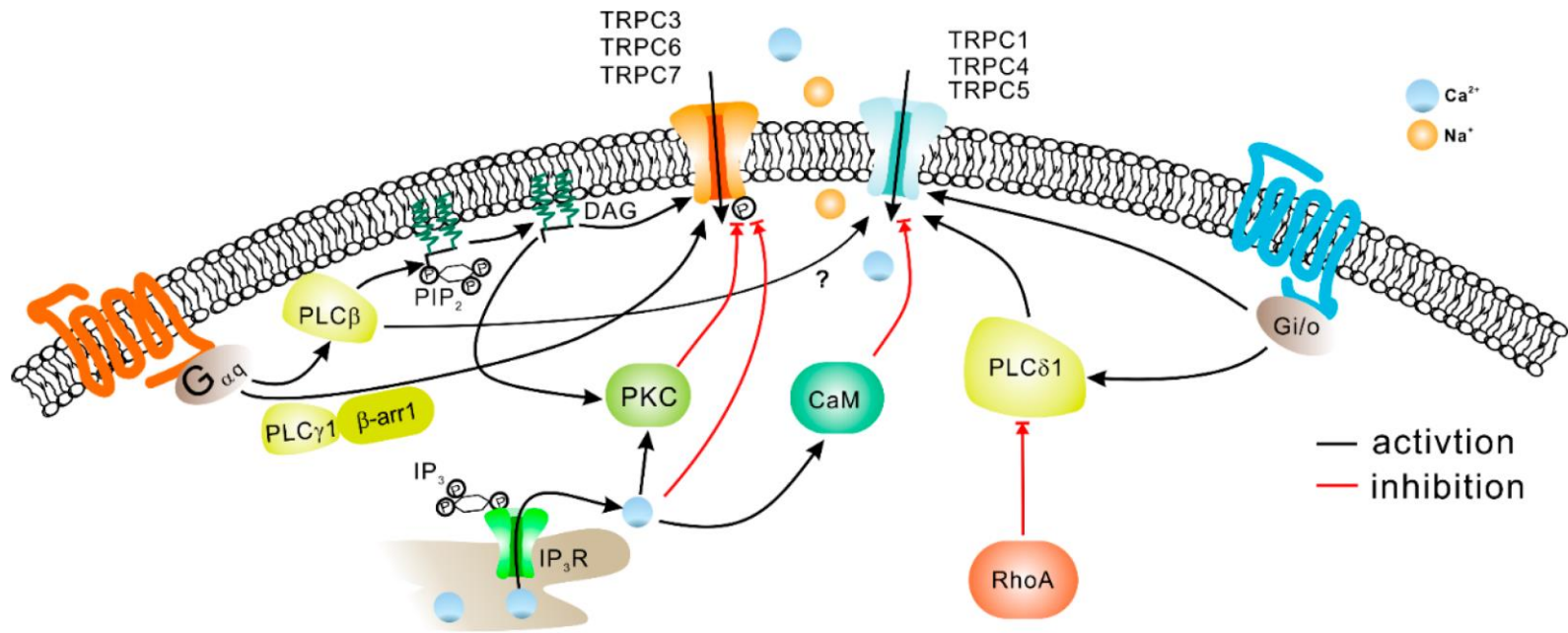
- ✓ Multiple intracellular messengers (integrators)
- ✓ Activation and modulation overlap
- ✓ Biophysical stimuli
- ✓ Ion concentrations
- ✓ Temperature
- ✓ Exogenous chemicals

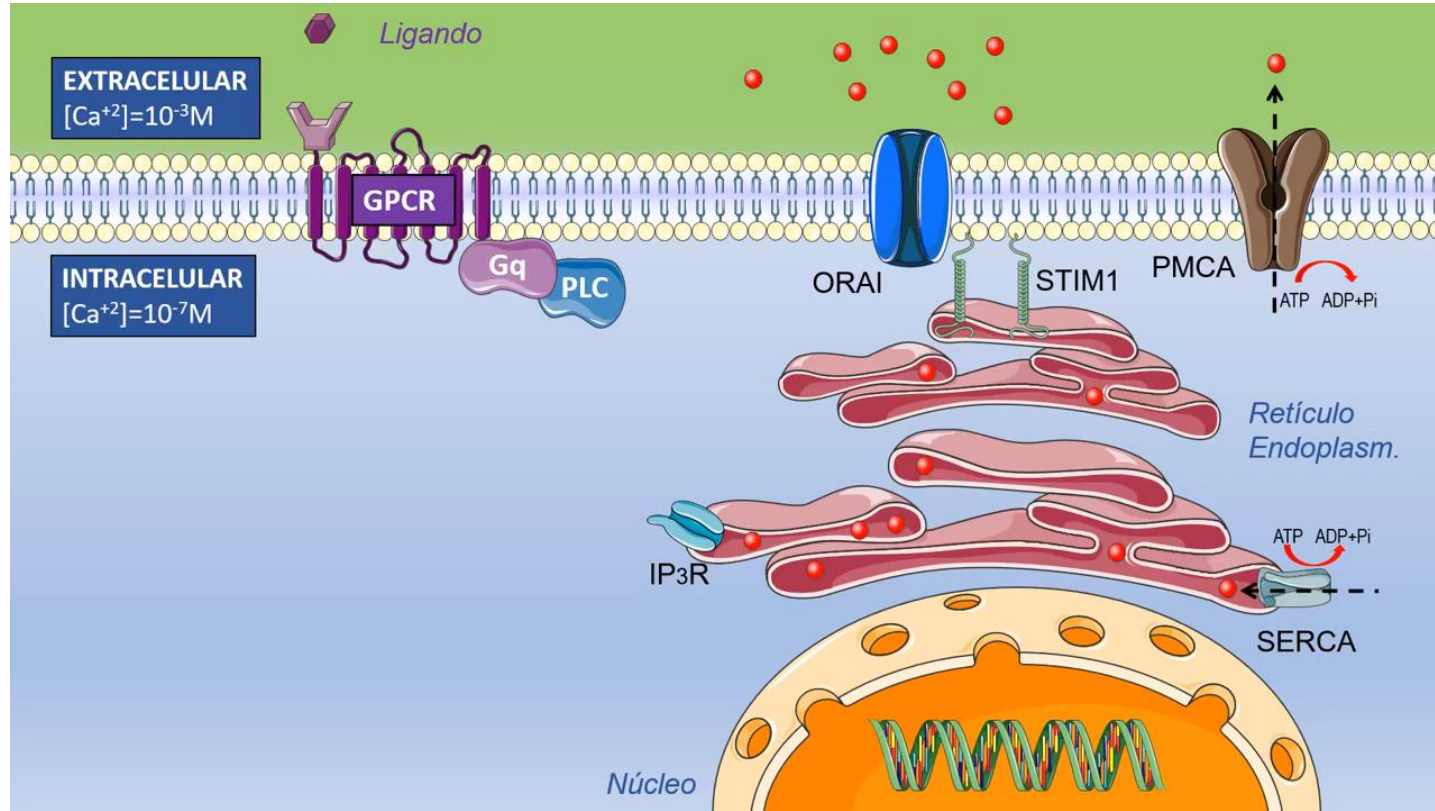
Permeability

- ✓ These are cation channels
- ✓ All TRP channels except TRPM4 and TRPM5 are permeable to Ca^{2+}
- ✓ High Ca^{2+} selective TRP channels are TRPV5 and TRPV6

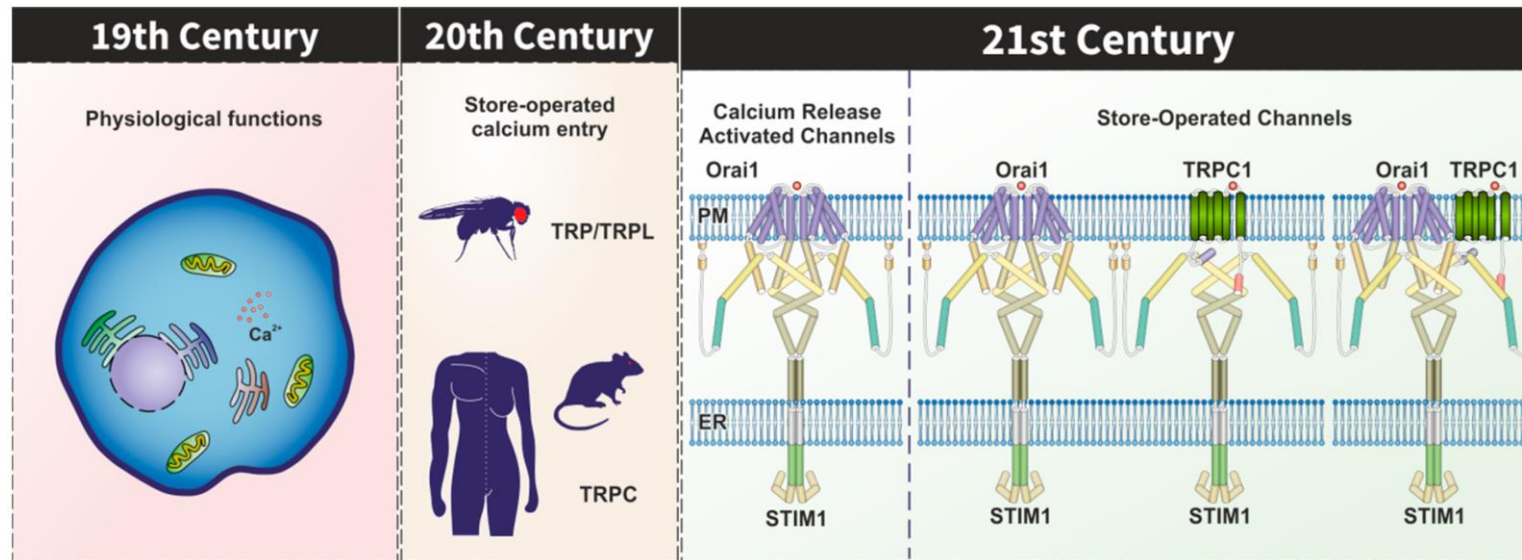
The physiological and pathophysiological roles of TRPC channels



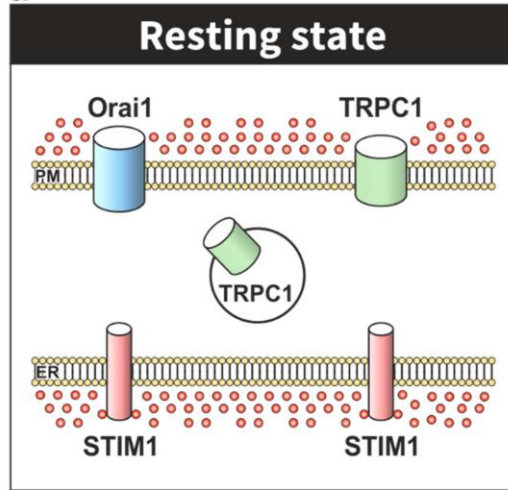




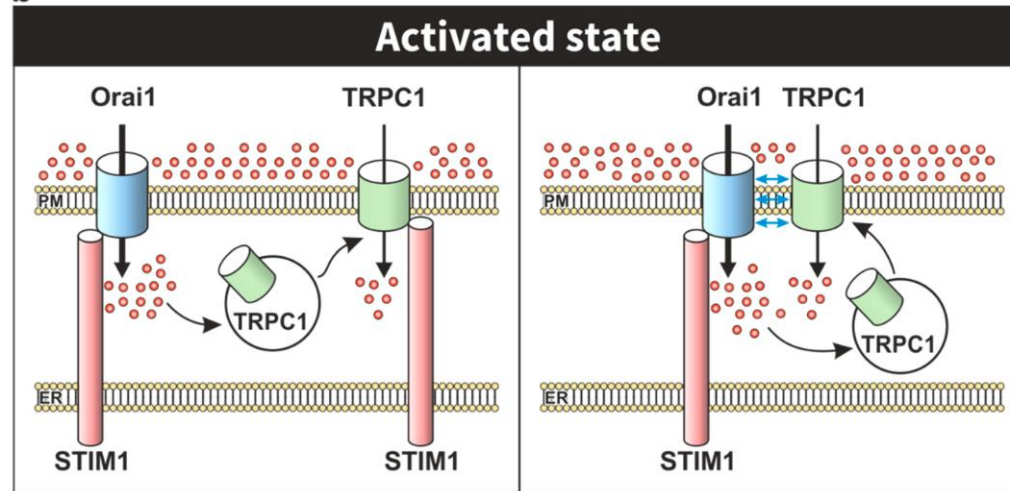
Milestones in the characterization of Ca²⁺ entry

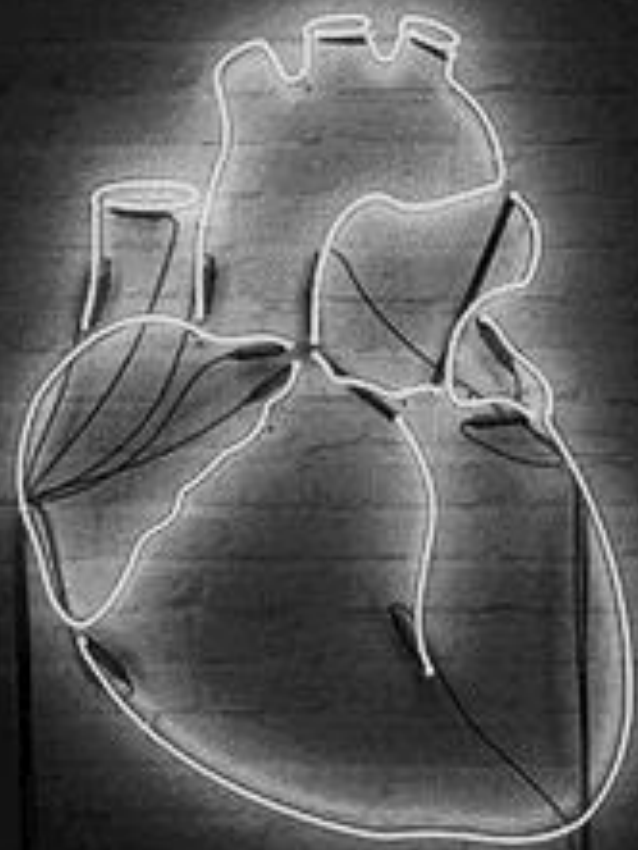


a



b



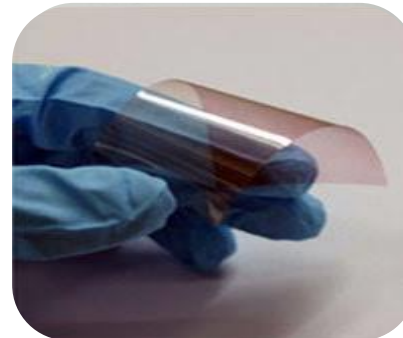
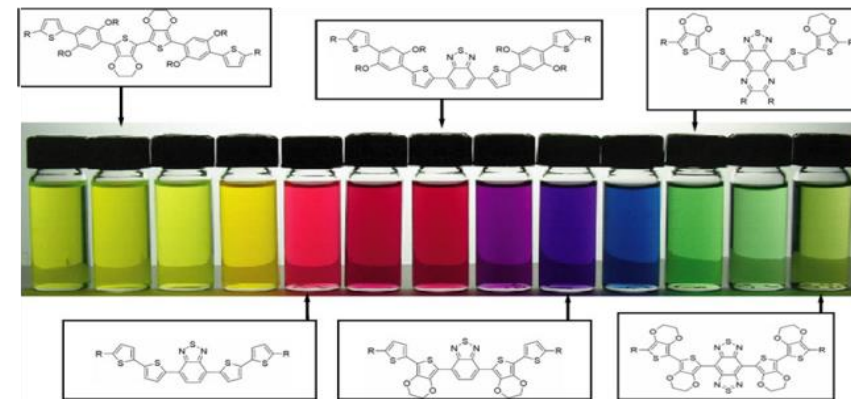


100%

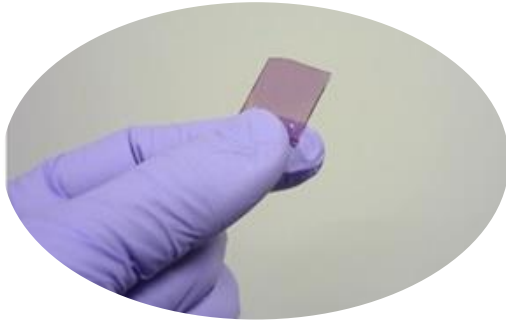
Organic semiconductors

Organic semiconductors have emerged as highly promising materials in biotechnology, thanks to several key-enabling features:

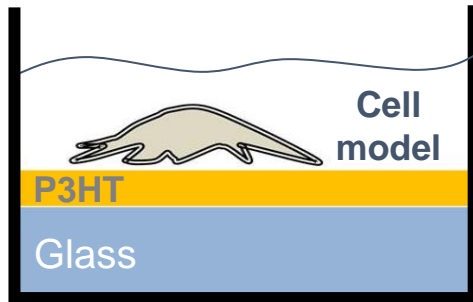
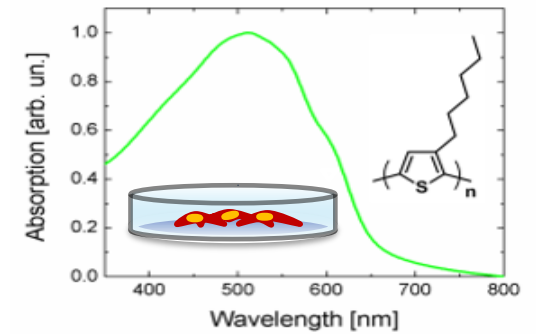
- support both electronic and ionic charge transport;
- sensitive to visible and near-infrared light;
- Solution-processable, soft and conformable;
- Highly biocompatible, suitable for *in vivo* implantation and long-term operation.



Poly(3-hexylthiophene-2,5-diyl)



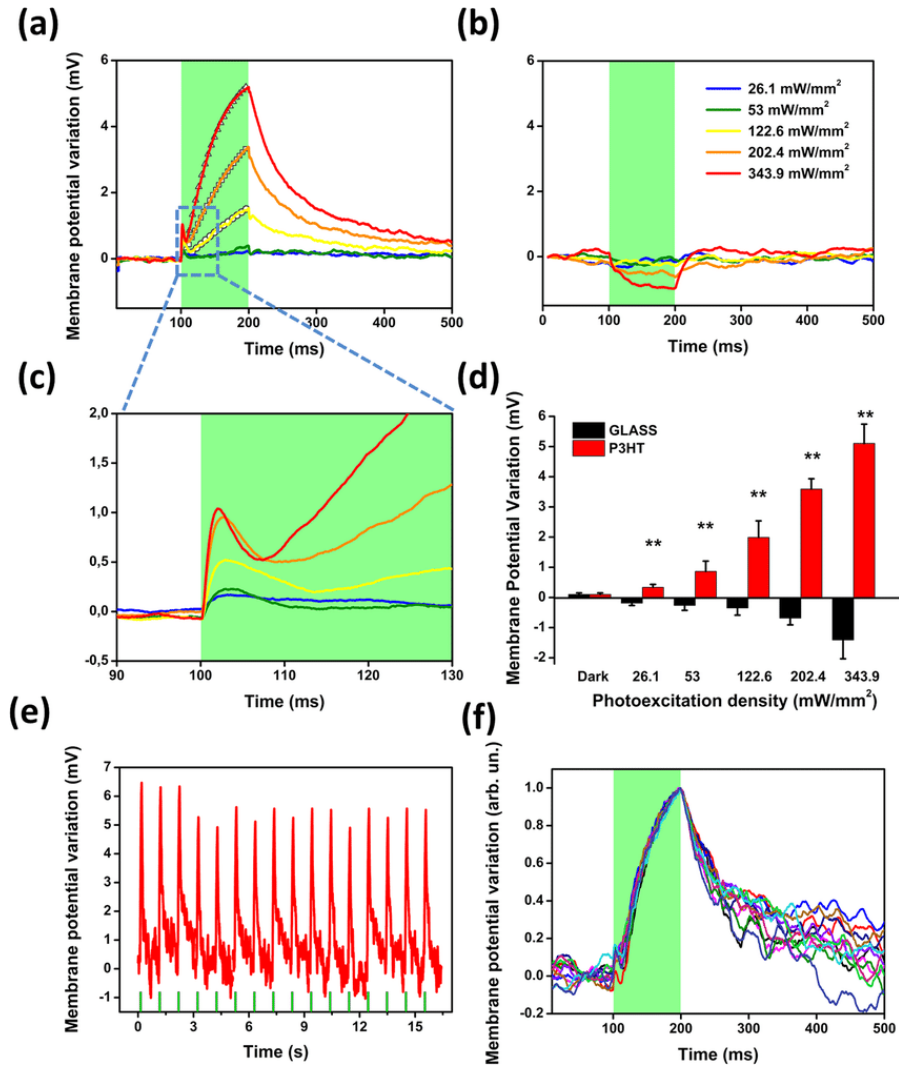
P3HT was the material of choice for light absorption and phototransduction.

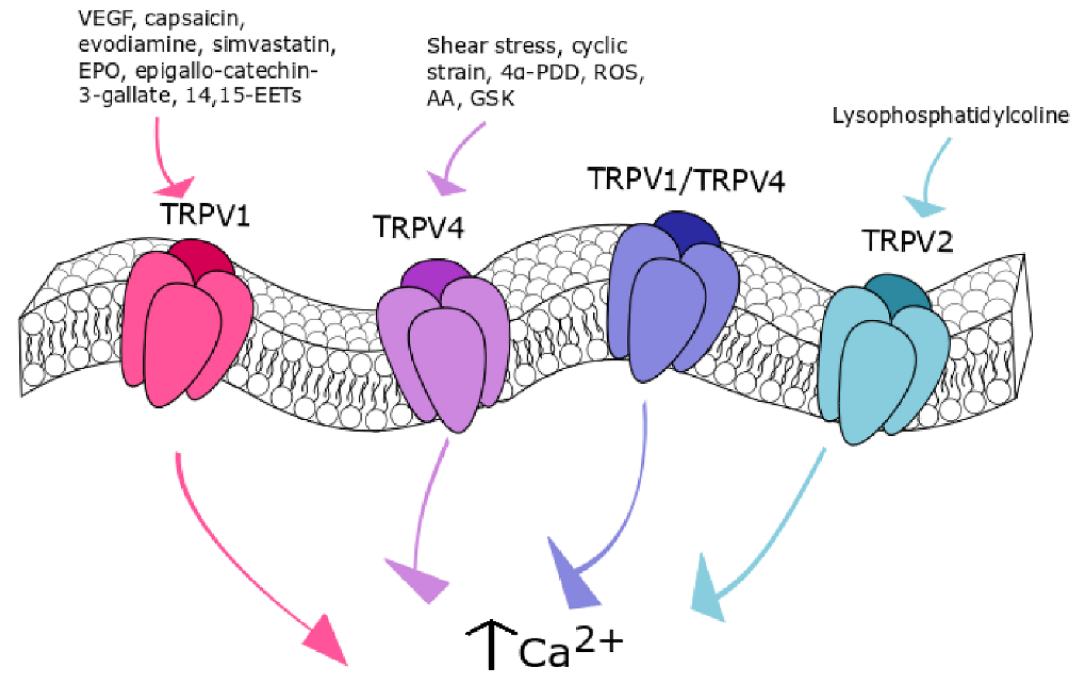


A thin film (150nm) of the polymer was spin-coated on glass substrate.



Polymer photoexcitation was provided by a green led, with light impinging from the bottom side.

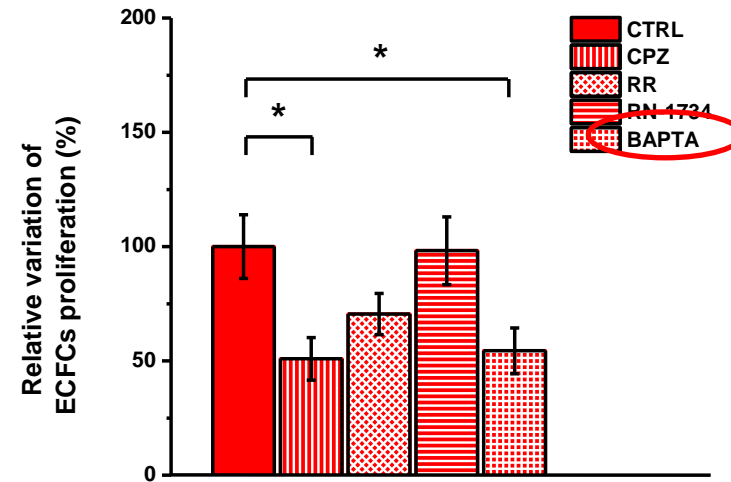
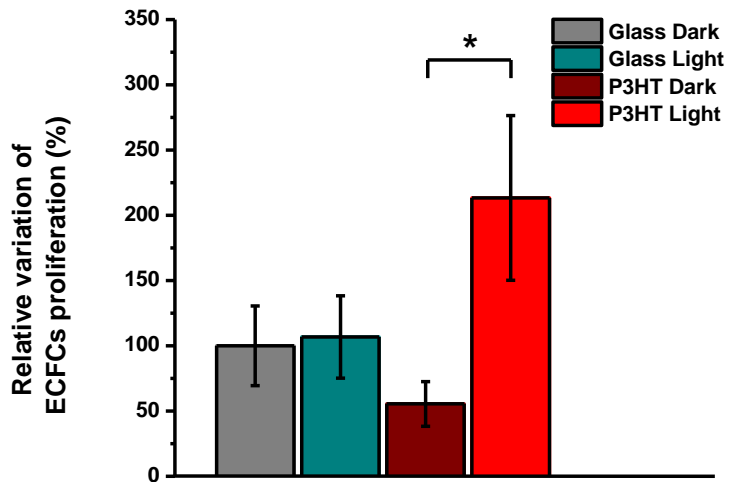
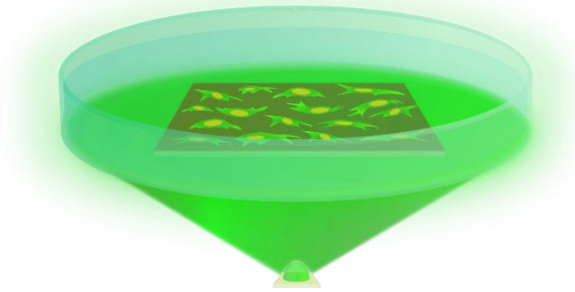




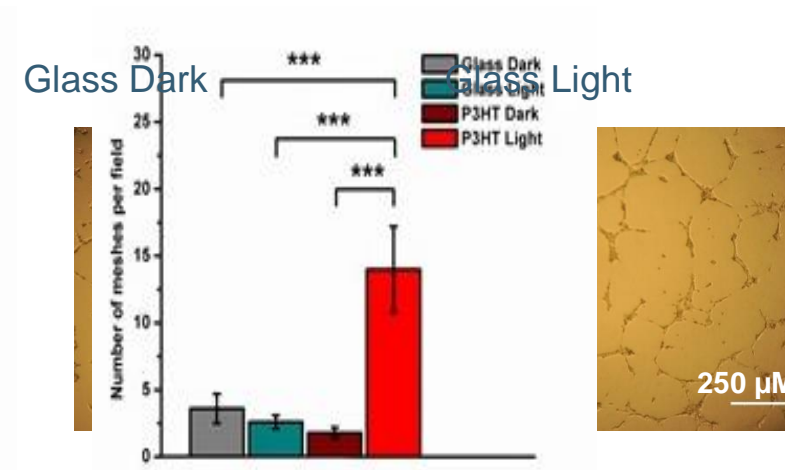
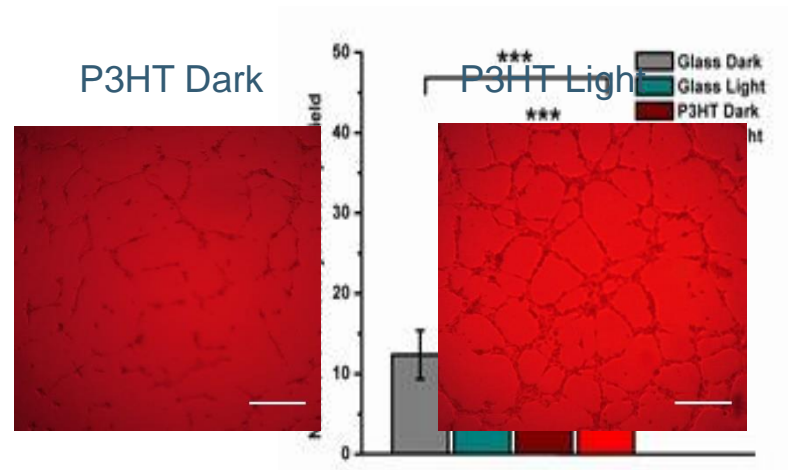
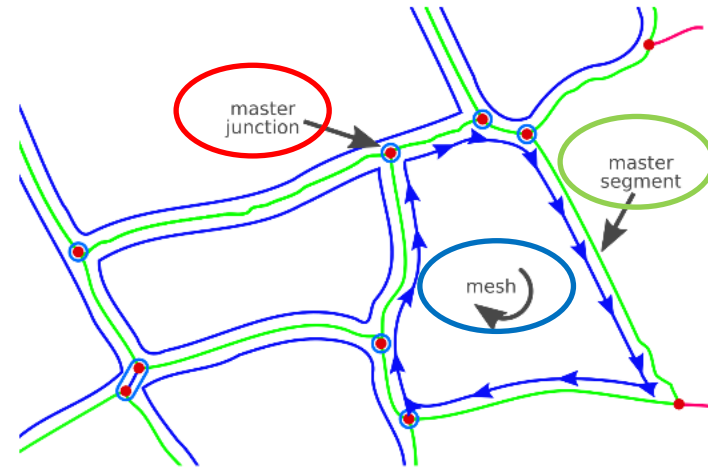
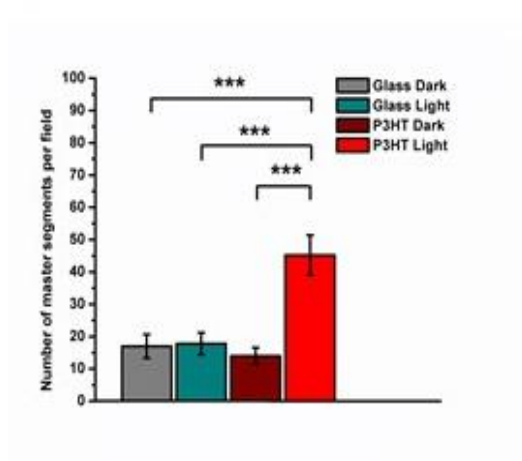
TRP subunit	Angiogenic processes regulated
TRPV1	Proliferation, migration and tube formation <i>in vitro</i> , angiogenesis <i>in vivo</i>
TRPV4	Proliferation, migration, tube formation, <i>in vitro</i> , angiogenesis and arteriogenesis <i>in vivo</i> , ECFC proliferation



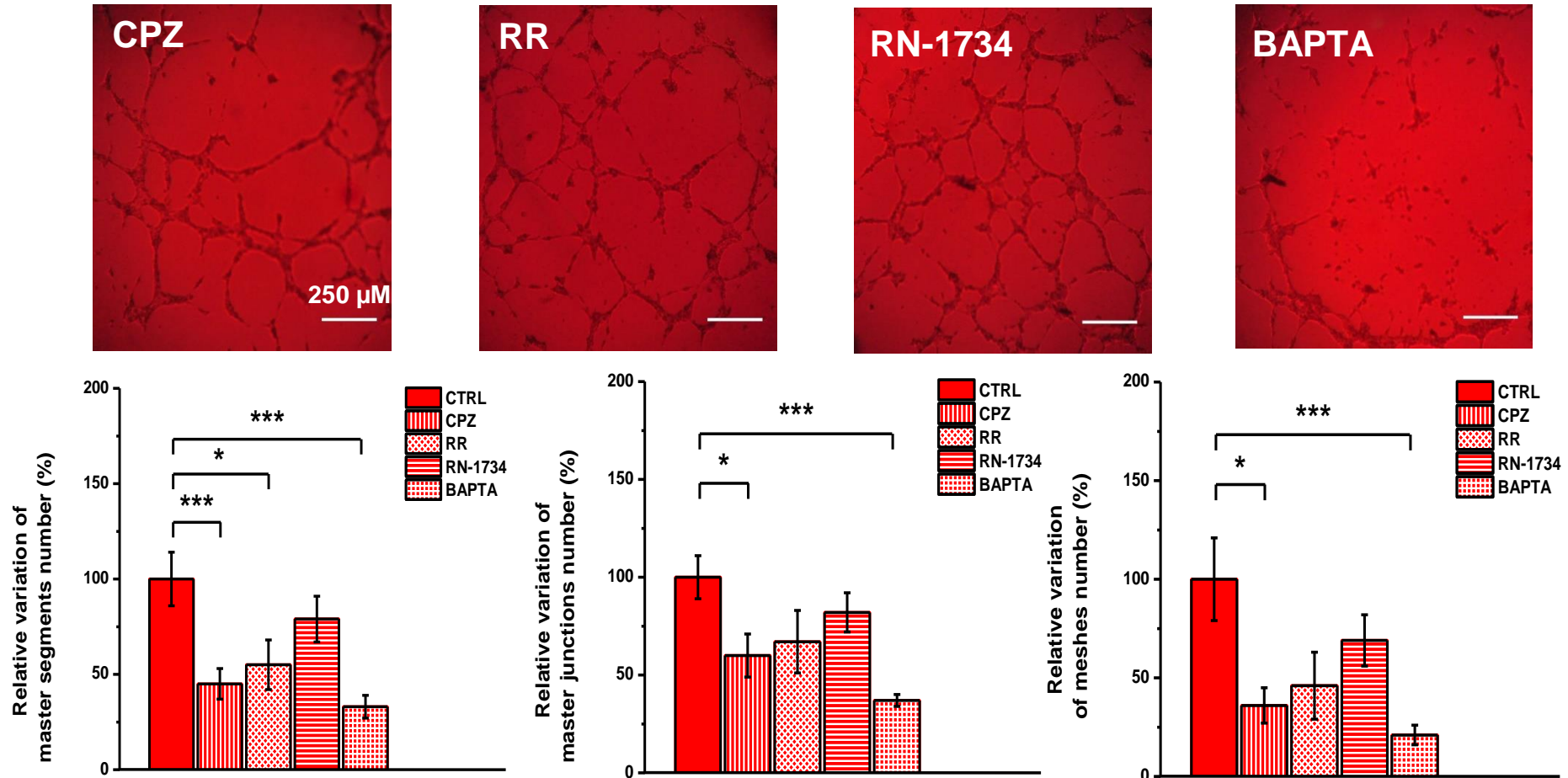
Polymer-mediated optical activation of TRPV1 stimulates proliferation in ECFCs



Light-induced photoexcitation stimulates tubulogenesis in ECFC cultures



Light-induced TRPV1 activation promotes *in vitro* tubulogenesis in ECFC cultures

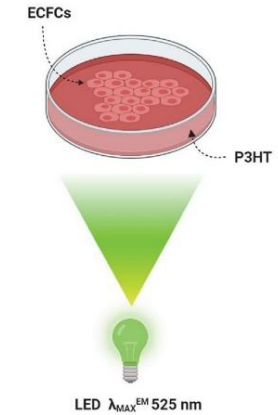
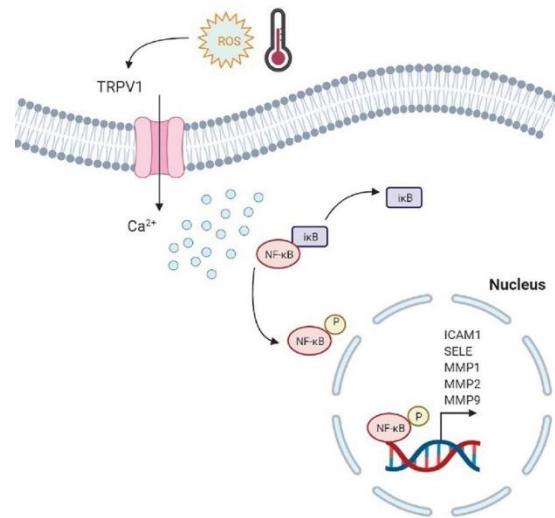


Towards Novel Geneless Approaches for Therapeutic Angiogenesis


Francesco Moccia^{1†}, Maria Rosa Antognazza^{2†} and Francesco Lodola^{2,3*}

¹Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia, Pavia, Italy, ²Center for Nano Science and Technology @Polimi, Istituto Italiano di Tecnologia, Milan, Italy, ³Department of Biotechnology and Biosciences, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy

We demonstrate that polymer-mediated optical excitation induces a robust enhancement of proliferation and lumen formation *in vitro*.



We identify the underlying biophysical pathway as due to light-induced activation of TRPV1 channel.



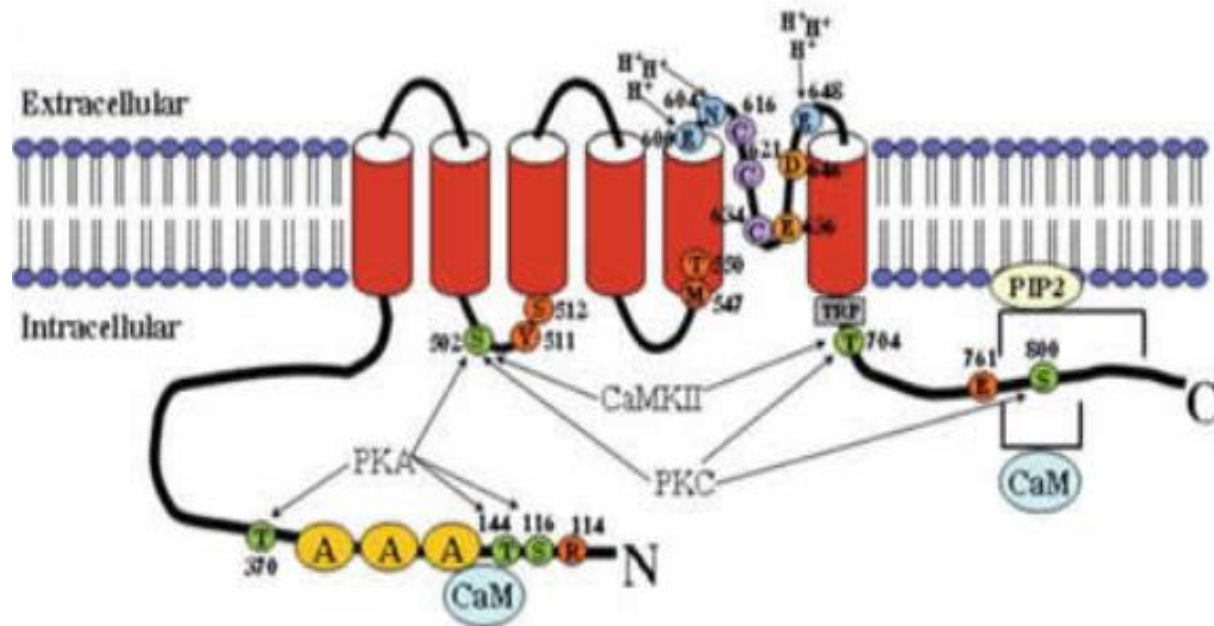
Lo splicing ganglio-specifico di TRPV1 è responsabile della percezione degli infrarossi nei pipistrelli vampiro (*Desmodus rotundus*)

«Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats»

Elena O. Gracheva, Julio F. Cordero-Morales, José A. González-Carcacía, Nicholas T. Ingolia, Carlo Manno, Carla I. Aranguren, Jonathan S. Weissman, David Julius

Cos'è TRPV1?

- Canale ionico presente in: - nocicettori -> agisce depolarizzandoli
- SNC
- 6 domini transmembrana e 1 loop = poro idrofobico (tra dominio 5 e 6)



Attivatori

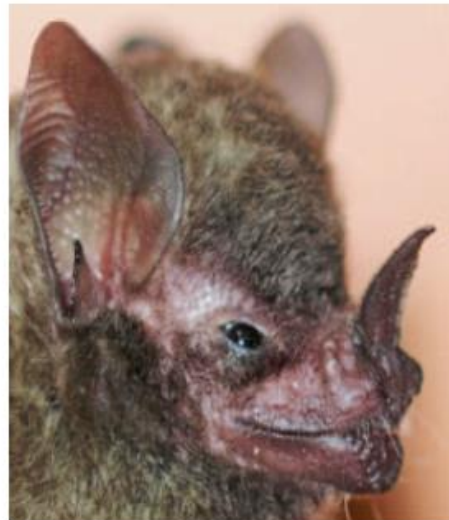
- Capsaicina 🌶️
- $T > 43^{\circ}\text{C}$
- Basso pH
- Voltaggio
- Lipidi

Introduzione: Pipistrelli vampiro

- Dieta = sangue
- Riconoscono radizioni infrarosso -> localizzano prede
- Fibre nervose del trigemino sul muso
- «Leaf pits»



Fruit bat (*C. brevicauda*)



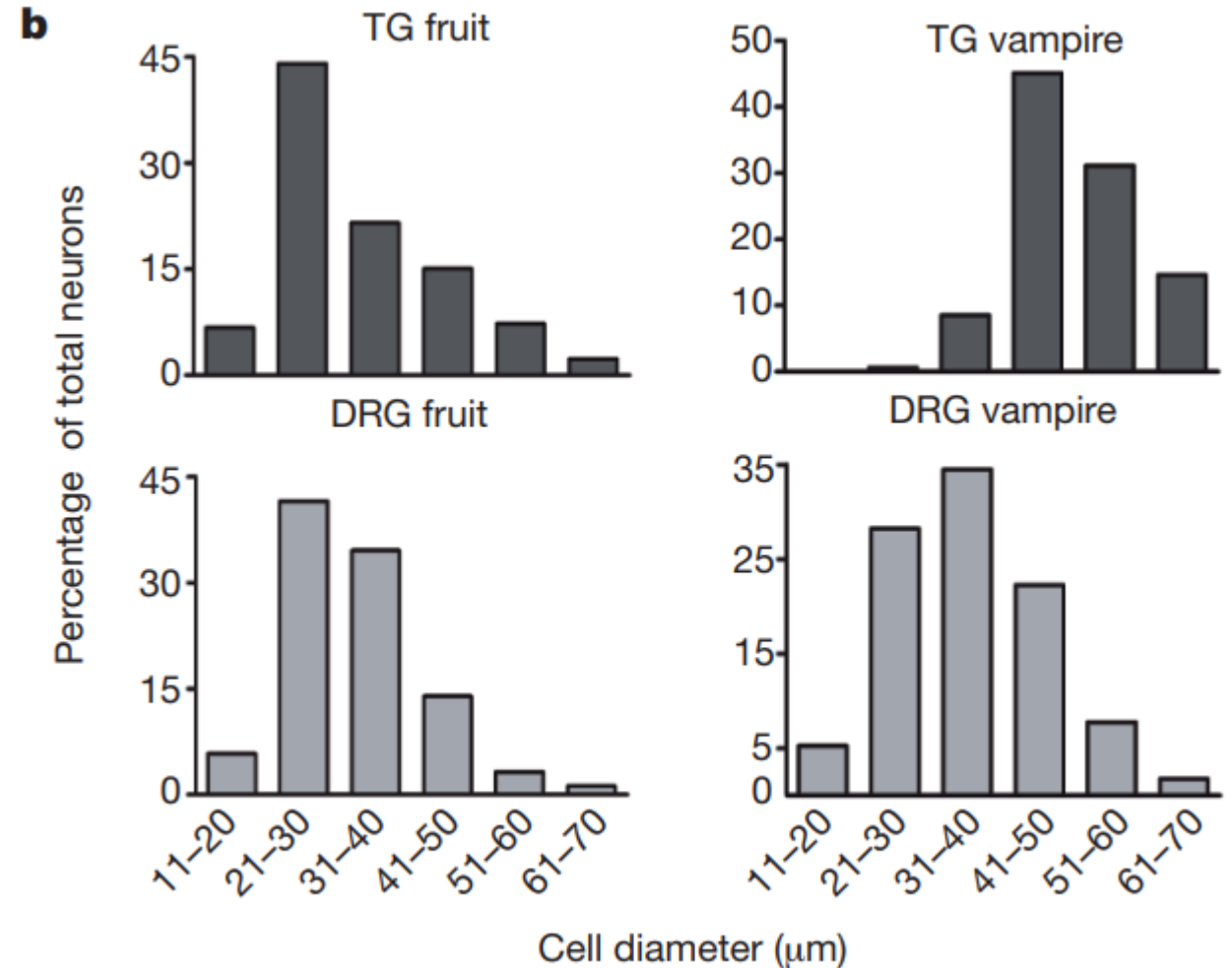
Vampire bat (*D. rotundus*)



Introduzione: Pipistrelli vampiro

- Gangli del trigemino (TG) con neuroni + grandi (come serpenti)
- Gangli della radice dorsale (DRG) sono normali

Specializzazione anatomica di TG nei pipistrelli vampiro per un ruolo nella **percezione degli infrarossi**

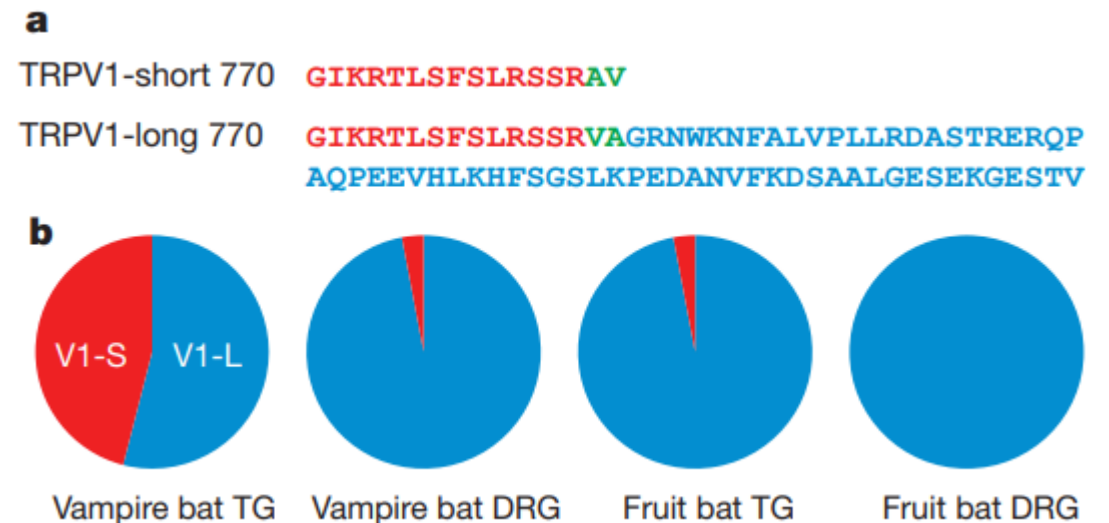


1. I gangli mostrano un pattern di espressione genica differente?

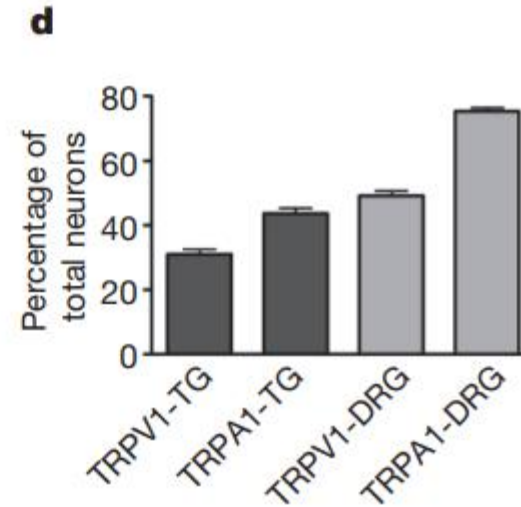
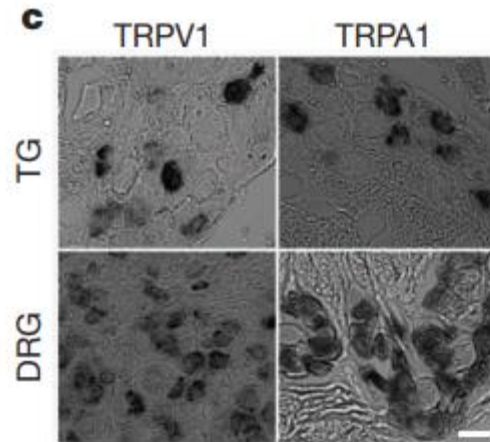
- Nuova isoforma corta del recettore TRPV1 = **TRPV1-S**
- Manca di 62 aa al C-ter
- Espressa solo a livello dei **TG** dei pipistrelli vampiro (non in DRG)
- Assente nei pipistrelli della frutta sia in TG che in DRG

Metodi

- Deep-sequencing dei cDNA provenienti da TG e DRG;
- Ibridazione in situ



1. I gangli mostrano un pattern di espressione genica differente?



TRPV1-S contribuisce alla funzione delle cellule TG di percepire gli infrarossi

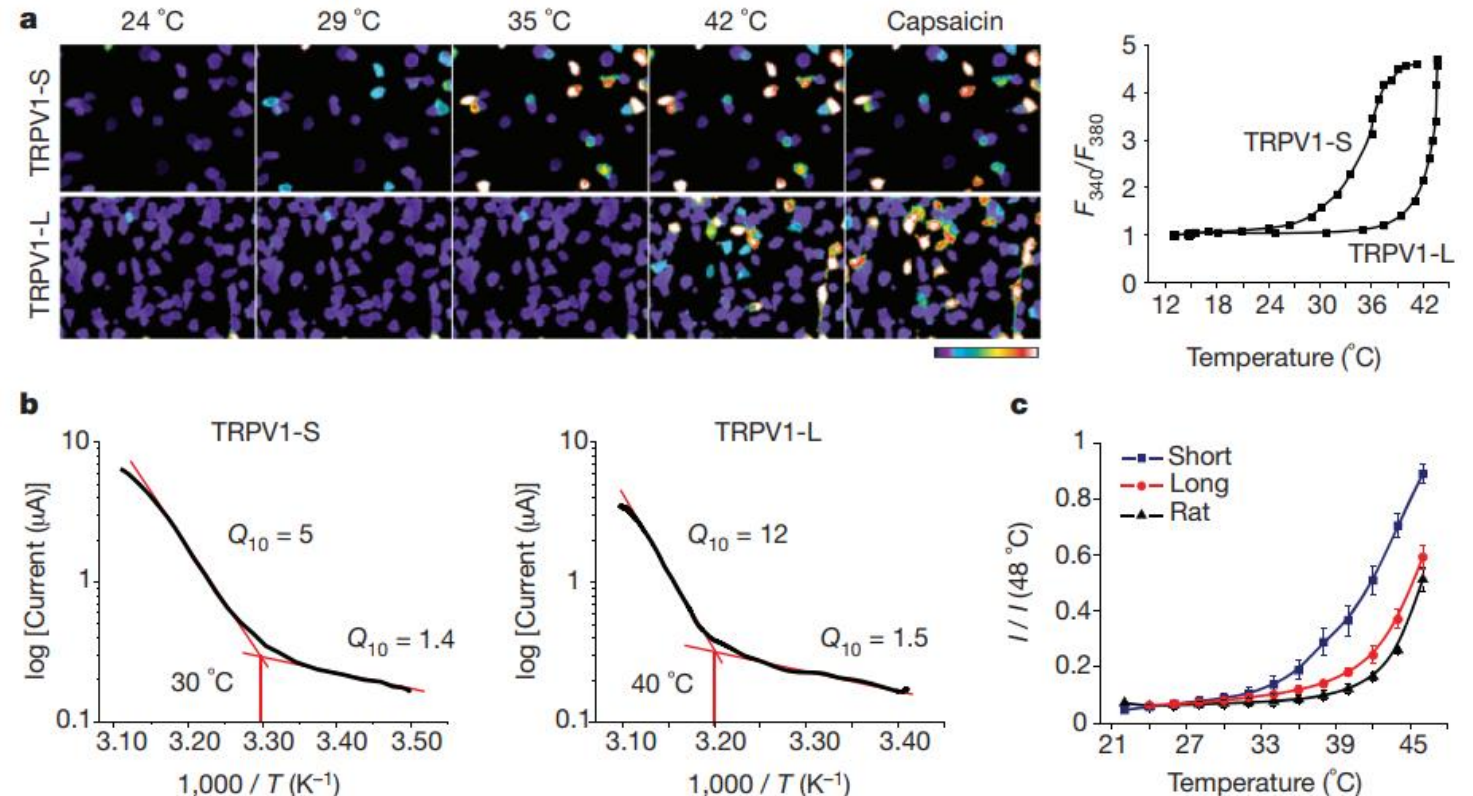
2. L'isoforma TRPV1-S ha dunque una sensibilità termica appropriata?

L'isoforma S si attiva a 30.5°C , l'isoforma L a 39.6°C .

~10 °C di differenza nella soglia di attivazione + espressione esclusiva dell'isoforma S nelle cellule TG

=

Ruolo di TRPV1 nella percezione dell'infrarosso.



Metodi

- Calcium imaging su cell HEK293;
- Saggio elettrofisiologico su oociti di *X. Laevis*.

3. La co-espressione delle due isoforme produce canali con una soglia termica inferiore rispetto all'espressione della sola isoforma L?

- L'espressione delle due isoforme produce un **eterotetramero**, con una soglia di attivazione di **33,9 °C**;
- la soglia dipende dalla isoforma dominante.

Se cellule TG esprimono pari livelli delle due isoforme, esse avranno una soglia termica inferiore rispetto a quando esprimono solo l'isoforma L.

Metodi

Iniezione di cRNA di TRPV1-S e -L in oociti.

4. Variazioni al C-ter di TRPV1 date dallo splicing alternativo

- Presenza di un'inserzione = **esone 14-a**, di 23 bp con uno stop codon;
- L'esone è affiancato da due regioni introniche dotate di siti donatori/accettori di splicing.

Metodi

Allineamento dei cDNA di TRPV1-S e -L

Formazione di due varianti che possono incorporare (iso S) o bypassare (iso L) l'esone 14-a.

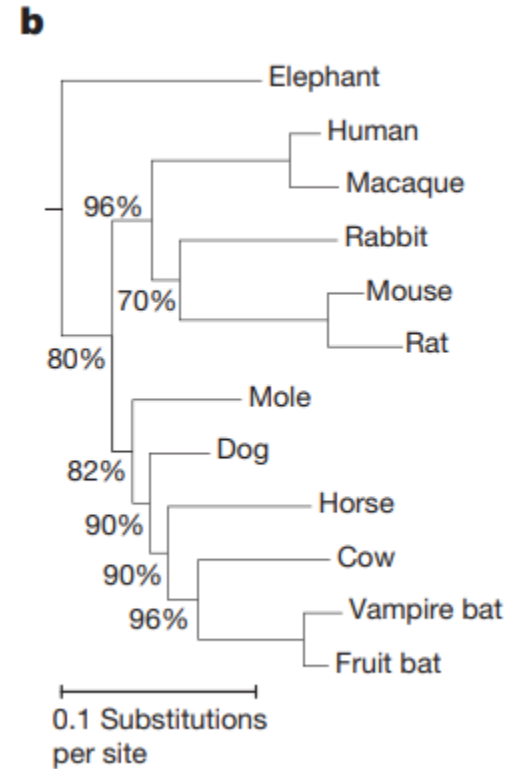
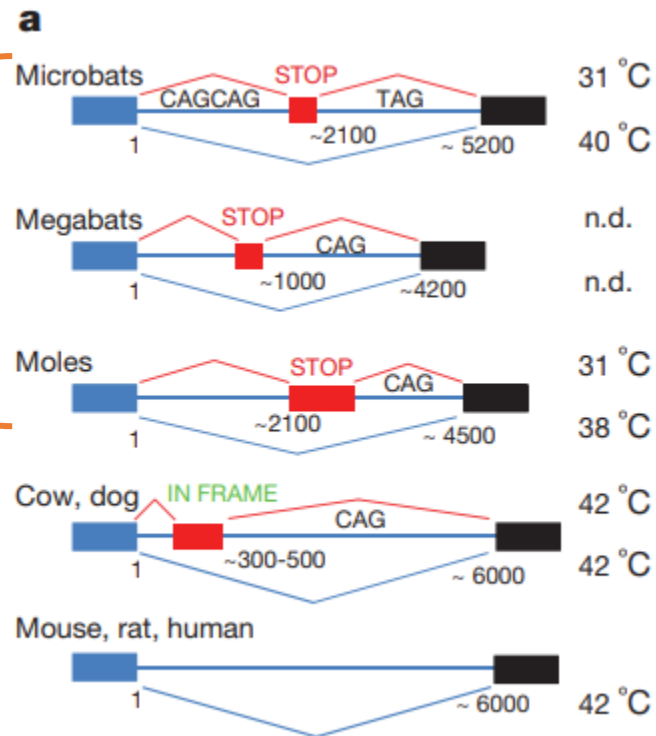


5. L'esone 14-a è un segno caratteristico anche di altri ordini di Laurasiatheria?

Isoforma S

Isoforma XL

Solo isoforma L



Metodi

Analisi di trascrittoma e/o genoma allineando le sequenze di diversi mammiferi

- **Eventi evolutivi indipendenti** hanno portato alla modificazione del gene.
- Filogenesi molecolare indipendente dei mammiferi.
- **Pipistrelli vampiro sono filogeneticamente più vicini a mucche, talpe e cani e meno ai roditori**

6. Si osserva splicing alternativo in cellule HEK293?

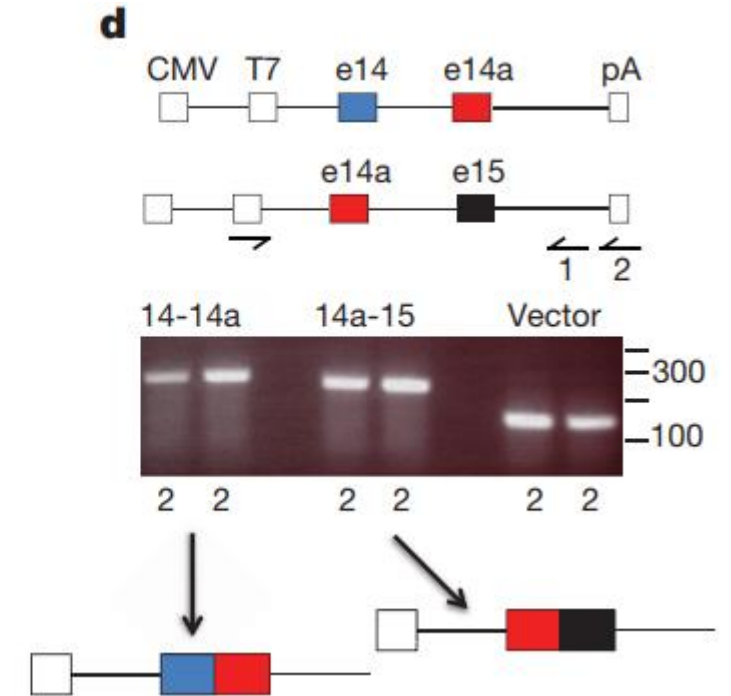
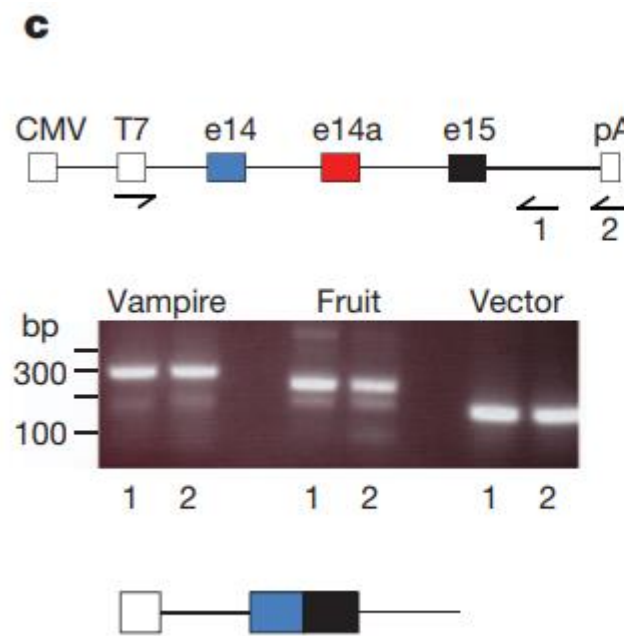
- Splicing degli esoni 14 e 15 che escludono il 14-a
- Il 14-a potrebbe essere coinvolto ma viene sfavorito nella competizione con gli esoni canonici.

Questo accade in:

- Cellule non neuronali di PV e PF
- DRG di PV e PF
- TG di PF, mucche e talpa

Metodi

Introdotti mini geni con regioni genomiche d'interesse



Lo splicing dell'esone 14-a nelle cellule TG dei vampiri pipistrello richiede un ambiente specializzato.

7. Specie più primitive e distanti evolutivamente usano strategie simili per l'adattamento termosensoriale?

Studio su **Zebrafish**

- TRPV1 ha una soglia a 32,9 °C;
- Ha un gap di 12 aa al C-ter, nello stesso sito dove nel PV abbiamo la giunzione di splicing.



Zebrafish e pipistrelli vampiro usano meccanismi differenti per generare variazioni al C-ter del gene TRPV1.

Conclusioni

- **Splicing dell'RNA** per produrre TRPV1-S = **rivelatore ipersensibile all'interno di un organo termosensoriale.**
- Il **C-ter**, diverso nelle varie isoforme, potrebbe interagire con i **fosfolipidi di membrana**, **modulando la sensibilità** agli stimoli termici e chimici.
- Il gene del canale TRP può rappresentare un **marker fisiologicamente rilevante** per valutare le **relazioni filogenetiche.**



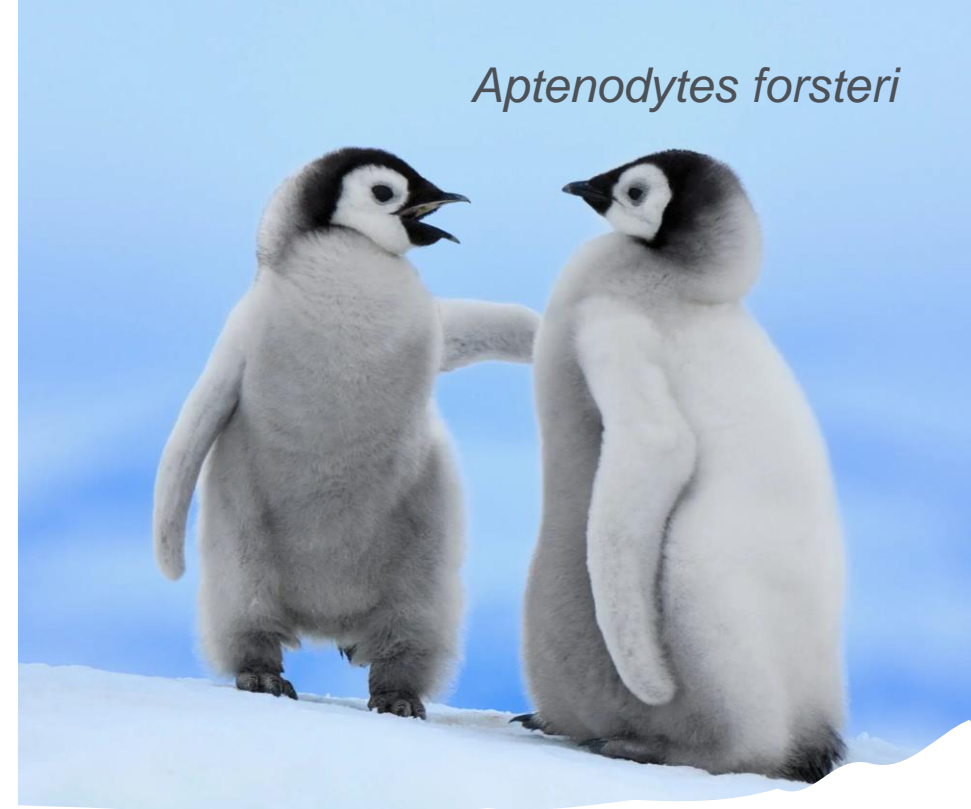


**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**

Loxodonta africana



Aptenodytes forsteri



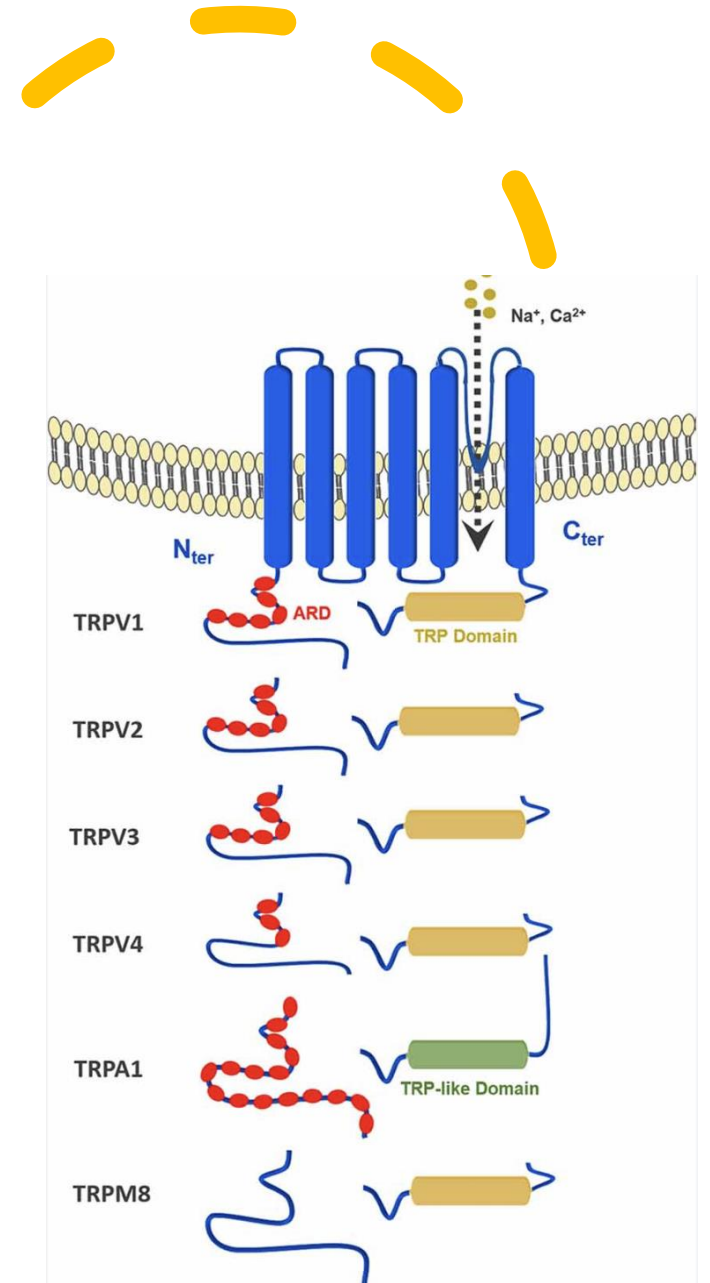
Come l'ambiente ha influenzato l'evoluzione di TRPM8, il canale del freddo

Anna Cascella e Valentina Verduci

Journal Club – Meccanismi funzionali di adattamento all'ambiente, Il modulo

I canali TRP

- Gruppo di canali ionici situati sulla membrana di numerosi tipi cellulari, ben conservati tra i phyla.
- Sanno mediare varie sensazioni come dolore, temperatura, diversi sapori, pressione e visione.
- Sono canali polimodali, possono essere attivati da molecole presenti anche in spezie come peperoncino (capsaicina), wasabi (allil isotiocianato), mentolo, canfora, cannabinoidi (THC, CBD),...
- La maggior parte viene attivata o inibita da segnali lipidici.



TRPM

I canali TRP melastatina (TRPM) sono una famiglia di 8 diversi canali che contengono intere proteine funzionali nei loro domini C-terminali.

I canali TRPM8 formano degli omotetrameri, ciascuna subunità ha un dominio transmembrana con 6 eliche:

- le prime 4 agiscono come sensori del voltaggio e permettono il legame di molecole come il mentolo e agonisti simili;
- le ultime 2 eliche e il loop di congiunzione formano il poro non selettivo che costituisce una regione idrofobica altamente conservata.

TRPM

Questi recettori di potenziale transitorio multimodali possono dunque riconoscere segnali di natura diversa.

Diventano permeabili a cationi, permettono ingresso selettivo di ioni nella cellula



Il flusso di ioni si traduce in impulsi elettrici che si propagano lungo le fibre sensoriali fino al cervello, che li interpreta mettendo in atto meccanismi di compensazione: col freddo il corpo tende a riscaldarsi mettendo in atto meccanismi come i brividi e la vasocostrizione.

TRPM8

TRPM8 è attivato da basse temperature, voltaggio e mentolo

Nell'intervallo di temperatura tra 18-25°C, grandi variazioni di entalpia ($\Delta H = -112$ kcal/mol) ed entropia ($\Delta S = -384$ cal/mol K) accompagnano il processo di attivazione

L'analisi termodinamica suggerisce che il processo di apertura comporta grandi cambiamenti conformazionali della proteina che forma il canale

Le temperature ambientali

La temperatura è un fattore critico con un grande impatto sul metabolismo di tutti gli essere viventi.

I neuroni periferici termosensibili del sistema somatosensoriale trasmettono costantemente informazioni sulla temperatura ambientale al SNC.





Importanza della
termosensibilità

The diagram consists of two rounded rectangular boxes connected by a horizontal arrow. The left box is yellow and contains the text 'Importanza della termosensibilità'. The right box is dark blue and contains the text 'canali termoTRP conservati tra i phyla animali'. The arrow points from the left box to the right box. There are also some yellow decorative lines on the left side of the slide.

canali termoTRP conservati
tra i phyla animali



A paradigm of thermal adaptation in penguins and elephants by tuning cold activation in TRPM8

Shilong Yang^{a,b,1} , Xiancui Lu^{a,c,1}, Yunfei Wang^{a,b,1}, Lizhen Xu^{d,1}, Xiaoying Chen^d, Fan Yang (杨帆)^{d,2} , and Ren Lai^{a,e,f,g,h,2}

^aKey Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences/Key Laboratory of Bioactive Peptides of Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, 650223 Kunming, Yunnan, China; ^bCollege of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, 150040 Harbin, China; ^cCollege of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, 100049 Beijing, China; ^dDepartment of Biophysics and Kidney Disease Center, First Affiliated Hospital, Institute of Neuroscience, National Health Commission and Chinese Academy of Medical Sciences Key Laboratory of Medical Neurobiology, Zhejiang University School of Medicine, 310058 Hangzhou, Zhejiang, China; ^eKunming Institute of Zoology–Chinese University of Hong Kong Joint Laboratory of Bioresources and Molecular Research in Common Diseases, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, 650223 Kunming, Yunnan, China; ^fSino-African Joint Research Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, 650223 Kunming, Yunnan, China; ^gCenter for Biosafety Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, 430071 Wuhan, Hubei, China; and ^hInstitute for Drug Discovery and Development, Chinese Academy of Sciences, 201203 Shanghai, China

Edited by David E. Clapham, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, and approved March 3, 2020 (received for review December 26, 2019)

To adapt to habitat temperature, vertebrates have developed sophisticated physiological and ecological mechanisms through

the structural and thermodynamic bases of TRPM8 cold activation, we attempted to gain insights from TRPM8 orthologs in

Introduzione

Sono stati sviluppati sofisticati meccanismi fisiologici ed ecologici con l'evoluzione per potersi adattare ai vari ambienti.

Questo studio si propone di studiare il modo in cui il freddo attiva il canale TRPM8, fino ad allora rimasto sconosciuto.

Sebbene mediante microscopia crioelettronica siano state risolte delle strutture ad alta risoluzione della proteina, quelle che riguardano il suo stato attivato dal freddo non sono ancora disponibili.

Dal punto di vista termodinamico, grandi variazioni di entalpia ed entropia sono associate all'attivazione per il freddo del canale.

L'attivazione di TRPM8 è correlata alla temperatura

Per comprendere le basi strutturali e termodinamiche dell'attivazione del TRPM8 hanno ottenuto informazioni dagli orologi della proteina in varie specie di vertebrati distribuite in diversi ecosistemi.

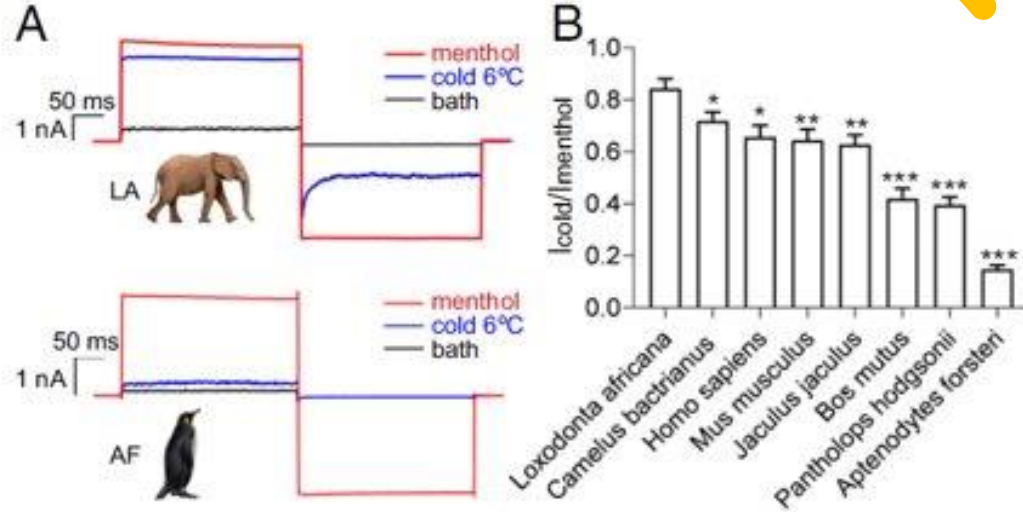
Hanno quindi osservato che la massima attivazione, in 8 diversi vertebrati con distinta idrofobicità della catena laterale (SCH) nel dominio del poro (PD), è correlata alla temperatura del loro habitat.

Vertebrati:

- 1) *AF, A. forsteri* (pinguino imperatore)
- 2) *BM, Bos mutus* (yak selvatico)
- 3) *CB, Camelus bactrianus* (cammello a due gobbe)
- 4) *HS, Homo sapiens* (uomo)
- 5) *JJ, Jaculus jaculus* (topo delle piramidi)
- 6) *LA, L. Africana* (elefante africano)
- 7) *MM, Mus musculus* (topo comune)
- 8) *PH, Pantholops hodgsonii* (antilope tibetana)

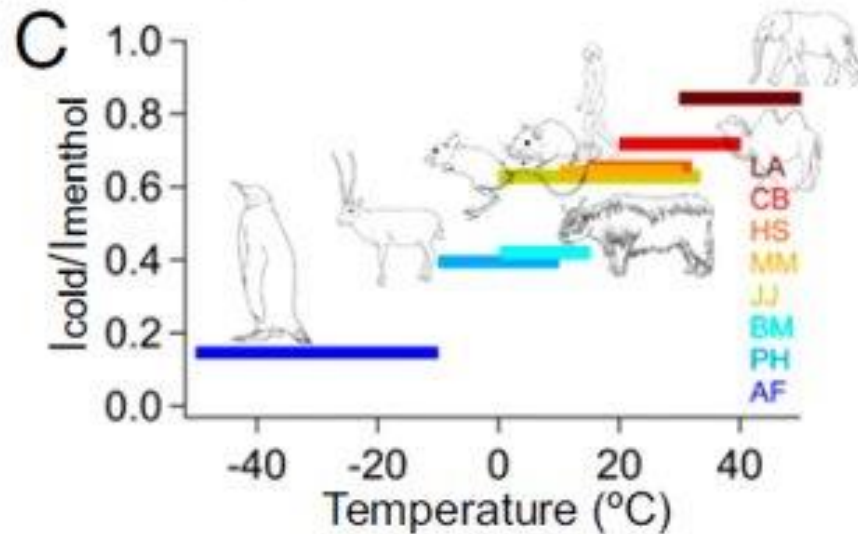
Lo studio giunge alla conclusione che il gene che codifica per TRPM8 definisce la preferenza di temperatura ed è stato probabilmente di grande influenza per l'evoluzione termica dei vertebrati che abitano l'ampia gamma di temperature dell'habitat in tutto il mondo.





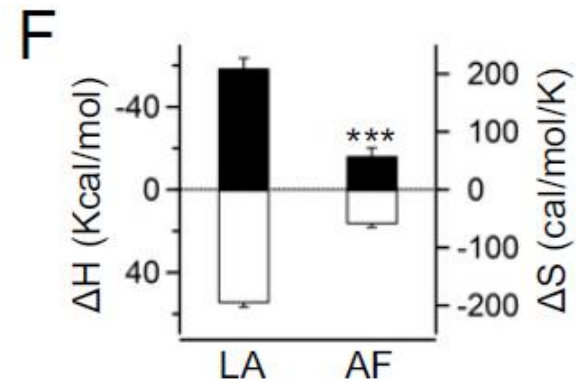
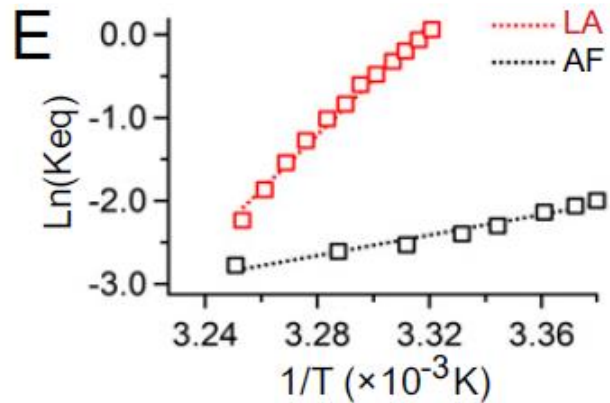
Le informazioni sono state ottenute misurando l'attivazione massima da parte del freddo rispetto all'attivazione a saturazione per il mentolo a una concentrazione di 1mM negli ortologi di TRPM8.

Nell'elefante africano (LA) hanno osservato che il raffreddamento a 6°C provoca un'attivazione robusta. Lo stesso raffreddamento attiva una corrente di entità minore nel pinguino imperatore (AF).



Agli estremi dei valori riscontrati troviamo le specie di pinguino imperatore ed elefante africano (con le correnti rispettivamente più basse e più alte attivate dal freddo).

La probabilità di apertura TRPM8 indotta dal mentolo a concentrazione satura è servita come massima probabilità di apertura.



Per il pinguino la variazione di entropia cresce meno perchè è meno sensibile alla variazione di temperatura ambientale, se un sistema è isolato, in termodinamica, subisce meno la variazione di entropia (il delta è minore), mentre per l'elefante la variazione di entropia è maggiore.

Le variazioni di entalpia e entropia rispettivamente sono la pendenza e l'intercetta nel grafico.

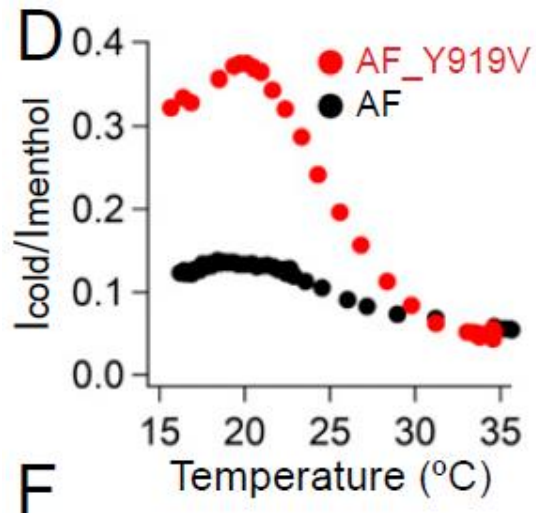
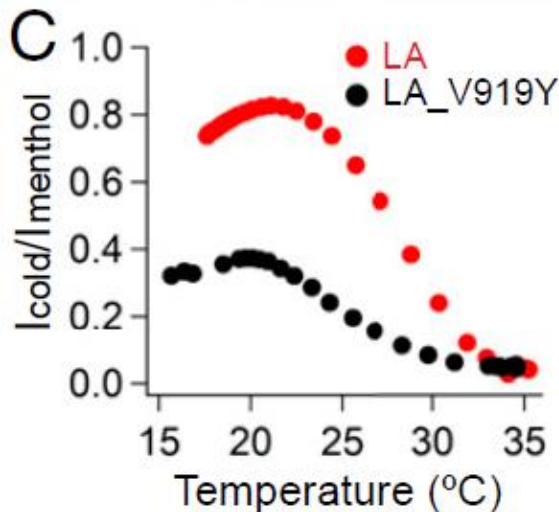
Dunque è stato osservato che TRPM8_LA ha una dipendenza dalla temperatura della corrente molto più ripida.

Calcolo di ΔH e ΔS

Per calcolare il cambiamento di entalpia (ΔH) ed entropia (ΔS) dovuto alla transizione guidata dalla temperatura di TRPM8, hanno costruito i grafici di Van't Hoff e li hanno adattati all'equazione $\ln K_{eq} = -\Delta H/RT + \Delta S/R$ dove R rappresenta la costante dei gas, T rappresenta la temperatura in Kelvin, K_{eq} rappresenta la costante di equilibrio misurata dalla probabilità di apertura TRPM8 a freddo, $K_{eq} = P_o/(1-P_o)$.

Il sito 919 è cruciale per l'attivazione del canale

Per verificare l'origine delle differenze del Δ di entropia ed entalpia si sono concentrati sui residui non conservati all'interno del dominio dei pori dei due canali (TRPM8_LA e TRPM8_AF).



Scambiando i residui non conservati tramite mutazione puntiforme si nota che la mutazione V919Y in TRPM8_LA ha ridotto significativamente la massima attivazione al freddo mentre la mutazione inversa in TRPM8_AF, quindi Y919V, ha aumentato l'attivazione al freddo del canale.



Transfezione cellulare transiente

Le cellule HEK293 sono state coltivate e incubate a 37°C con il 5% di CO₂.

Le cellule sono state trasfettate con costrutti di canali e plasmide di proteina fluorescente verde potenziata (eEGFP).

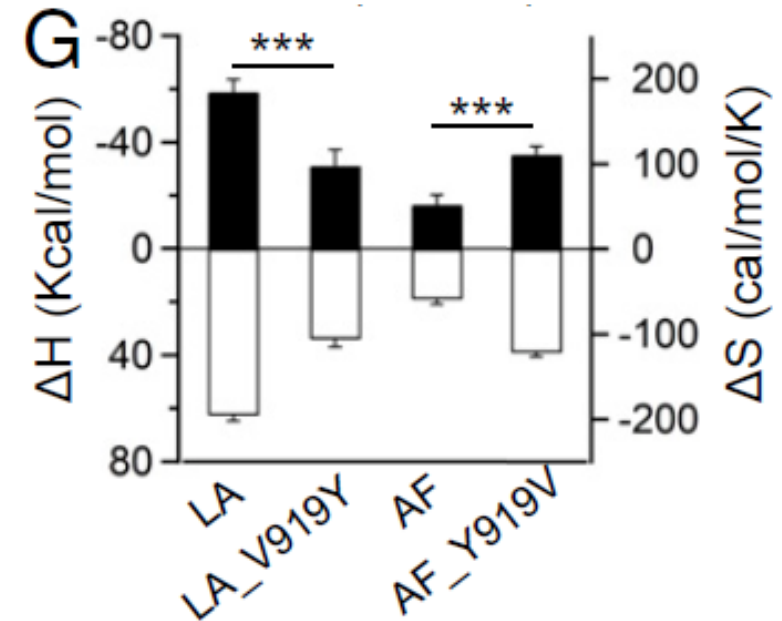
Le cellule sono state successivamente digerite tra 1-2 giorni dopo la trasfezione.

Le registrazioni con patch clamp sono state eseguite dopo che le cellule sono state attaccate al vetrino.

ΔH e ΔS dei canali mutati

Le osservazioni fatte supportano l'idea secondo la quale il dominio del poro (PD) svolgerebbe un ruolo cruciale nell'attivazione del canale poichè mutazioni al sito 919 influenzano in modo significativo le proprietà del recettore.

Nel grafico si mostrano le variazioni di ΔH e ΔS tra wt e mutati.

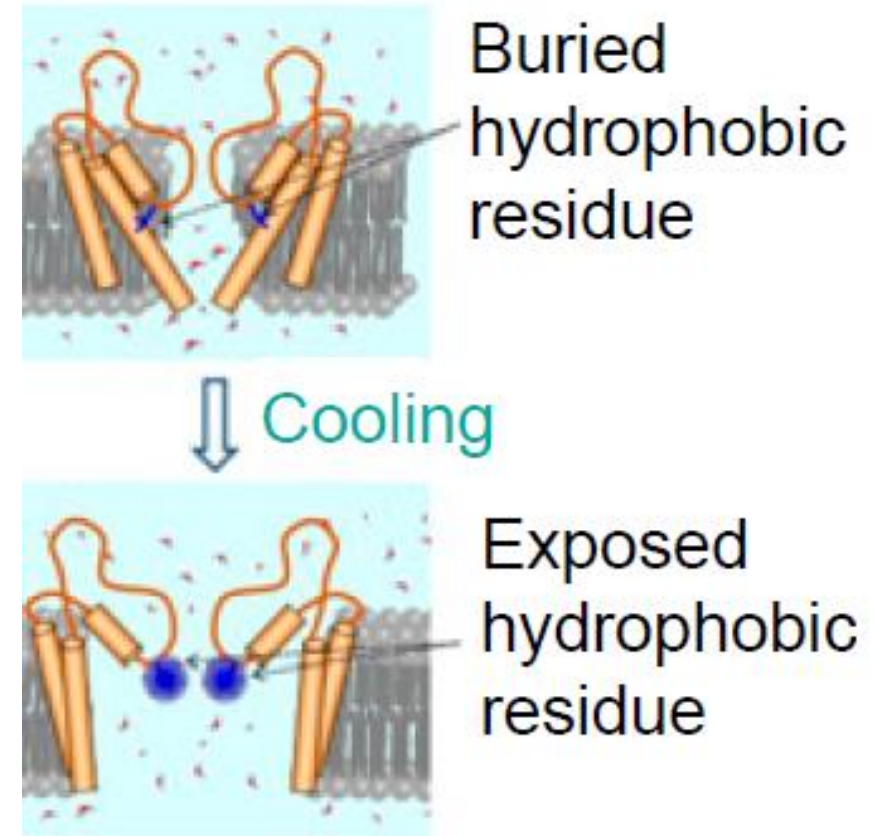


Stati conformazionali dei residui chiave durante l'attivazione

Per verificare il principio secondo il quale avvengono cambiamenti dell'attivazione causati dalla sostituzione amminoacidica (Val->Tyr) hanno esaminato le potenziali mutazioni che possono alterare le proprietà termodinamiche dei canali.

Il cambiamento nella capacità termica specifica (ΔC_p) della proteina del canale è associato al controllo della temperatura dei canali TRP.

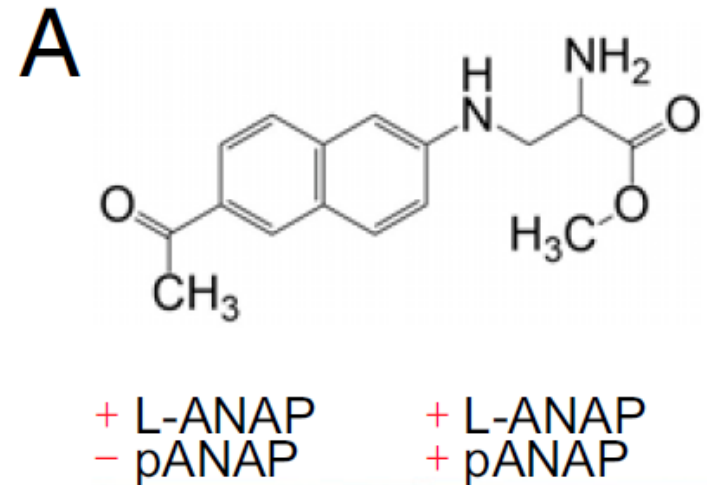
Quando la catena laterale di un residuo idrofobico transita dallo stato chiuso (buried) allo stato aperto (water-exposed) le variazioni di ΔC_p saranno positive, portando ad un aumento della risposta al freddo.



Da controllare due aspetti:

- 1) Riconoscere le catene laterali di cui i residui subiscono i cambiamenti conformazionali durante l'attivazione.
- 2) Misurare i cambiamenti di risposta fisiologica andando ad alterare l'idrofobicità della catena laterale dei residui che cambiano stato.

È stato utilizzato un aa innaturale: l'acido 3-(6-acetilnaftalen-2-ilammino)-2-aminopropanoico (ANAP) per monitorare i riarrangiamenti conformazionali.



ANAP è stato incorporato nella proteina TRPM8_LA introducendo un codone di stop

Incorporazione dell'amminoacido ANAP in 142 siti nei vari domini transmembrana di TRPM8_LA

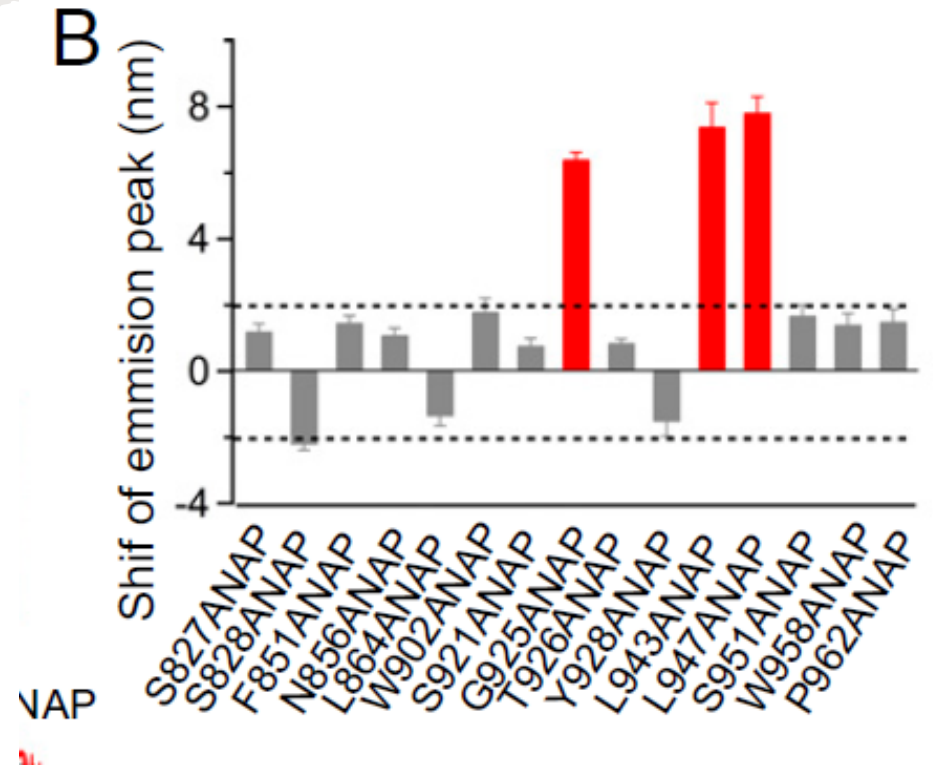


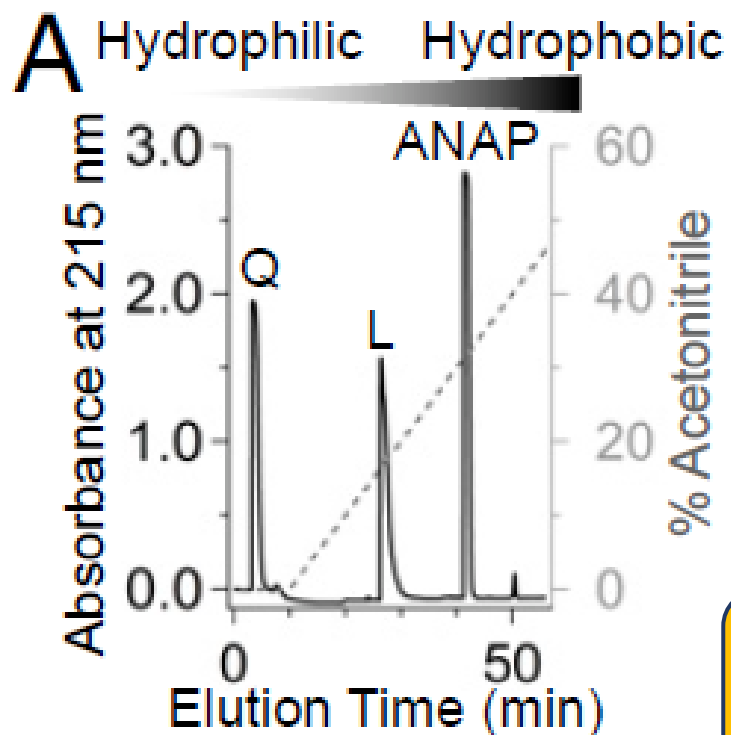
15 canali con ANAP rimanevano ancora attivati dal freddo, quindi mutanti funzionali -> determinazione residui cambiati conformazionalmente nelle catene laterali.

In particolare 3 mutanti hanno mostrato un significativo spostamento nel loro picco di emissione ANAP suggerendo che siano passati allo stato aperto durante l'attivazione al freddo.

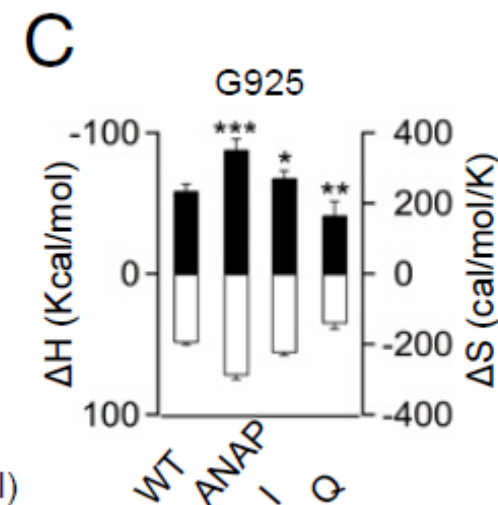
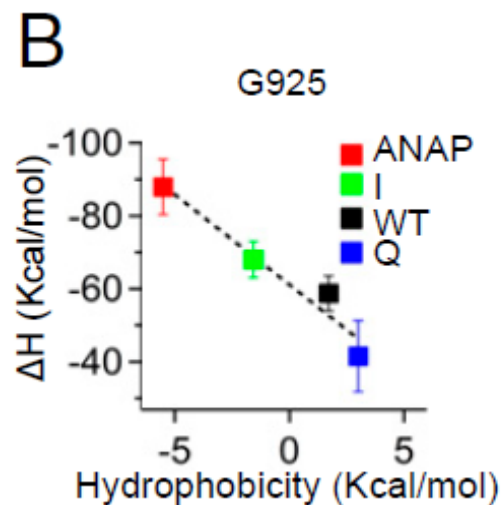
L'incorporazione di ANAP non modifica la permeazione ionica del canale.

Ulteriori studi sono stati fatti sui residui amminoacidici in quelle posizioni : 925, 943, 947.





Q : glutammina
 L : leucina
 I : isoleucina
 WT : glicina

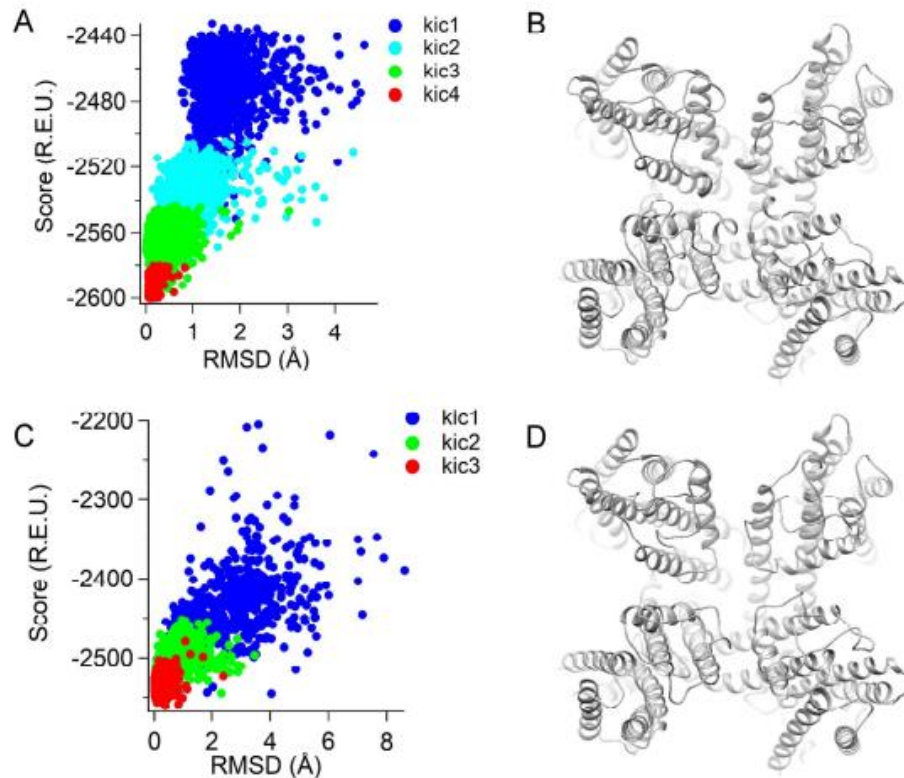


Inducendo mutazione in questi 3 residui,
 ci si aspettava che un residuo più idrofobico avrebbe aumentato la
 risposta al freddo,
 al contrario se idrofilico la risposta sarebbe diminuita.

L'idrofobicità di ANAP è stata determinata tramite cromatografia in fase inversa (la fase stazionaria- idrofobica- è meno polare della fase mobile).

Con l'aumento di SCH usando ANAP o isoleucina , I valori di ΔH e ΔS sono aumentati, portando a una minor resistenza al freddo.

Al contrario la glutammina idrofilica ha prodotto una diminuzione di ΔH e ΔS quindi conferendo minore sensibilità al freddo.



Modeling of the TRPM8_LA channel in the closed and cold-activated states.

performed using the Rosetta molecular modeling suite version 2016

Predizione strutturale con programmi dedicati, usando strategia per modellare computazionalmente lo stato delle molecole.

È stato confermato quanto atteso, avendo in posizione 919 un residuo più idrofobico (isoleucina al posto di valina), ΔH e ΔS aumentati.

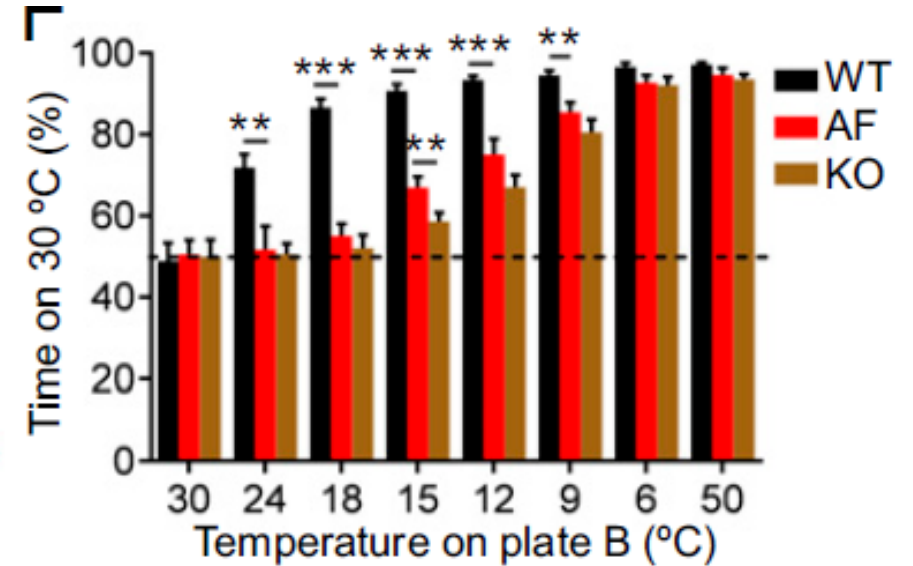
Con treonina idrofila ΔH e ΔS diminuiti. Misurati con patch clamp (Il *patch clamp* è una tecnica usata in elettrofisiologia per misurare le correnti che attraversano singoli canali ionici presenti nella membrana cellulare.)

Knockin di topo

A ulteriore conferma, è stato fatto il topo knockin per il canale TRPM8 del pinguino imperiale (transgenico).

Rispetto ai wt, sia i topi mutati che i topi knockout per il gene preferivano temperature più fredde, tollerandole meglio.

Altre funzioni del canale, nei knockout, erano compromesse come la risposta agli stimoli chimici, sottolineando le molteplici funzioni del canale.



CONCLUSIONE

Il canale TRPM8 è una proteina allosterica in cui gli apparati sensibili allo stimolo sono energeticamente accoppiati al gate di attivazione come in altri canali TRP.

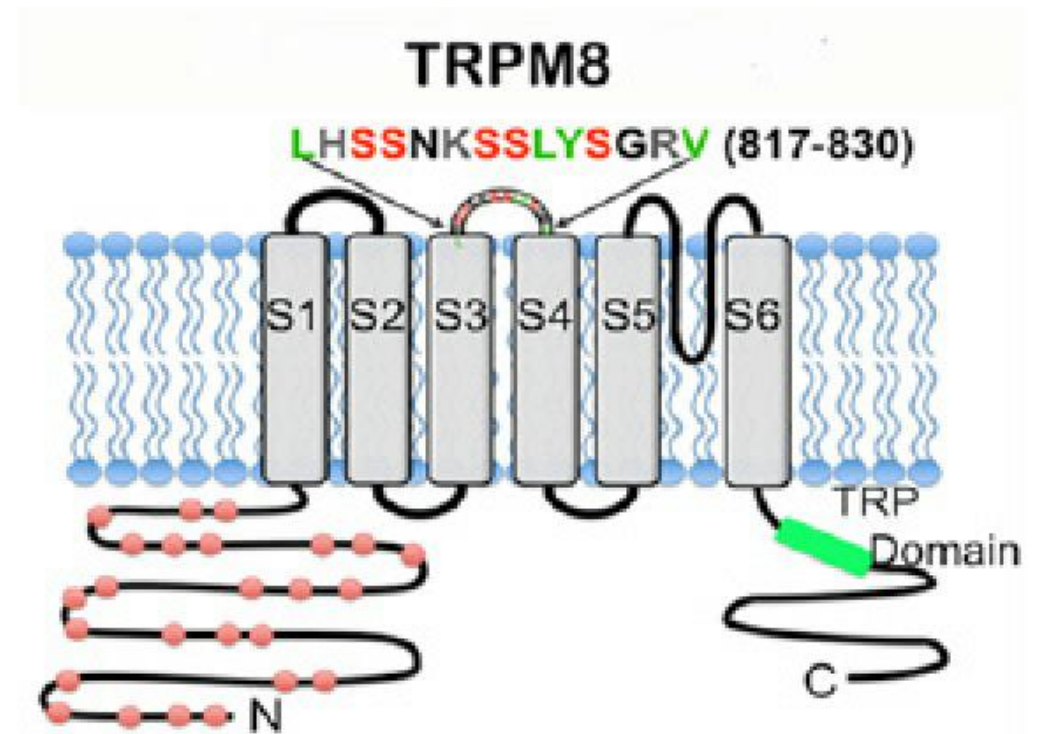
Il PD di TRPM8 è fondamentale per le proprietà di attivazione per freddo, che possono essere coinvolte come parte dell'apparato di rilevamento del freddo.



CONCLUSIONE

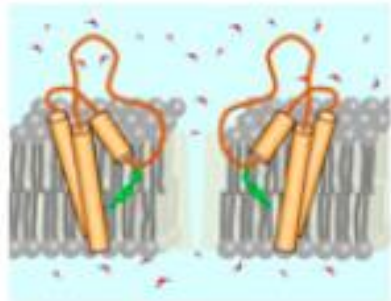
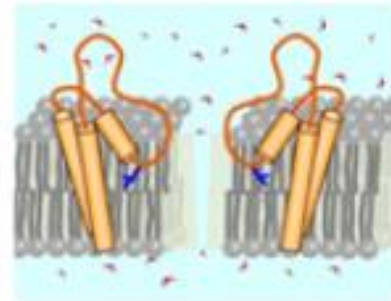
Per il sito 919 in particolare, dove le mutazioni hanno ampiamente alterato l'attivazione per freddo negli ortologi TRPM8, ci sono diverse possibilità riguardo al suo ruolo specifico nei meccanismi di controllo della temperatura:

- 1) Il PD può contenere un sensore di temperatura con il sito 919 che agisce come parte del gate superiore
- 2) il sito 919 può essere un sito modulatore mentre l'effettivo "sensore di temperatura" si trova altrove
- 3) il sito 919 fa parte di un gruppo sparso che in qualche modo è coordinato di residui che "rilevano" la temperatura



G

Cold tolerance



Warm

Cold

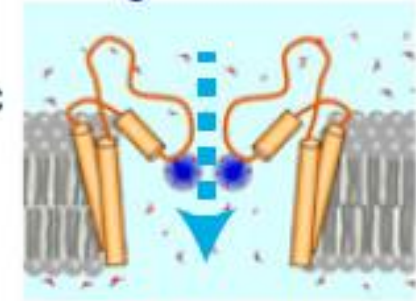
Residue exposed: **more** hydrophobic

Higher cold sensitivity

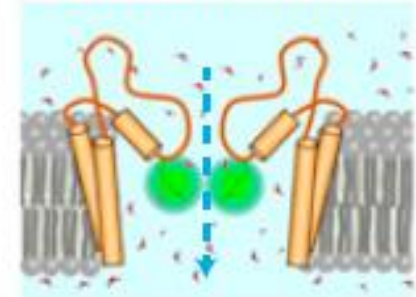
Residue exposed: **less** hydrophobic

Smaller cold sensitivity

Larger ion flux



Smaller ion flux



Dato che il guscio di idratazione formato dalle molecole d'acqua che circondano la catena laterale idrofobica esposta è più stabile a temperature più basse, hanno postulato un meccanismo di controllo della temperatura in cui il freddo rende energeticamente favorevole lo stato esposto dei residui idrofobici nel PD, portando all'apertura del gate di attivazione all'interno del PD.



**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**

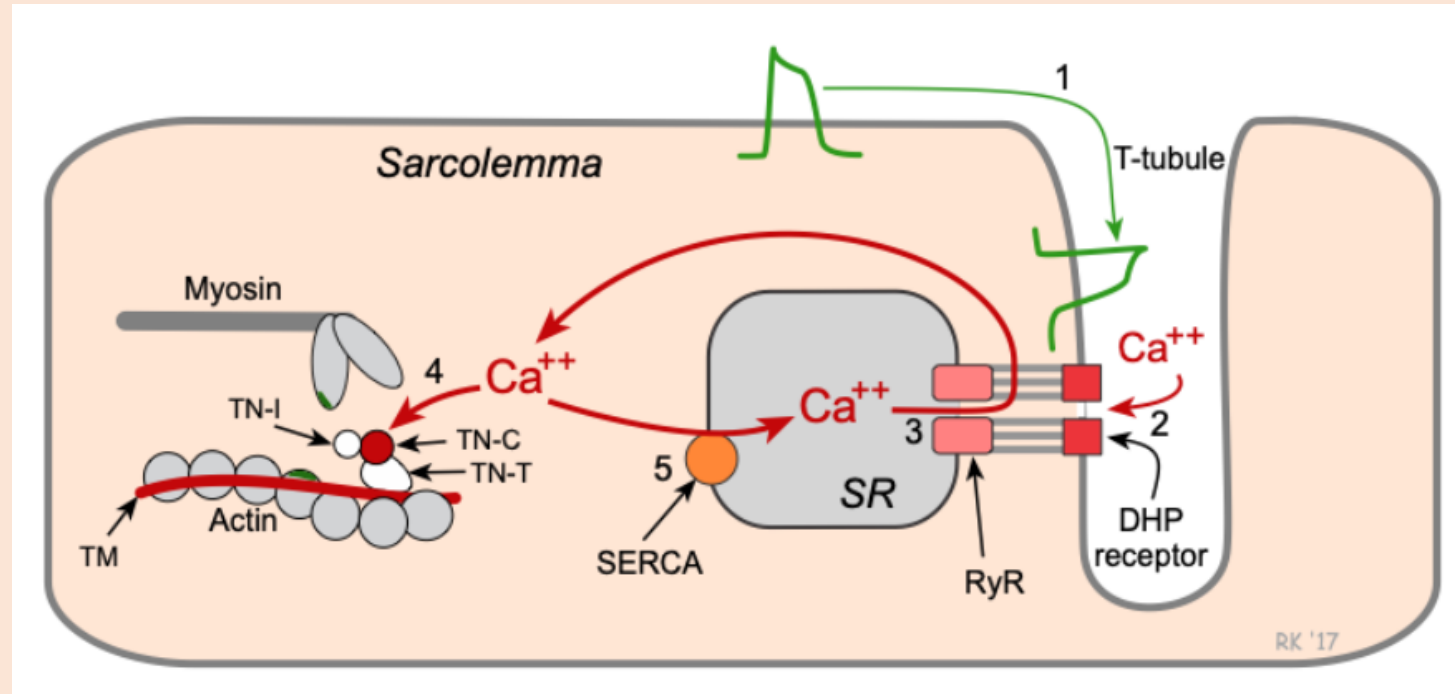
Transcriptional regulation of intermolecular Ca^{2+} signaling in hibernating ground squirrel cardiomyocytes: The myocardin–junctophilin axis

Yang et al. 2020

Simone Sinh Agostinelli
Luca Binda

Meccanismi Funzionali di Adattamento all'Ambiente 2022-2023

E-C COUPLING



Letargo

Meccanismo di sopravvivenza al freddo invernale.

La temperatura del corpo è *down-regolata*.

L'ipotermia prolungata generalmente altera l'omeostasi del Ca^{2+} nei mammiferi non ibernati

I mammiferi ibernati come lo scoiattolo della terra sono capaci di down-regolare la loro temperatura corporea senza conseguenze patologiche.





Letargo

L'efficienza della segnalazione intermolecolare tra LCC-RyR aumenta.

La contrazione miocardica è maggiore rispetto quella nell'animale non in letargo.

L'accoppiamento fisico tra TTs e SRs è più stretto.

Cosa hanno osservato?

La contrazione del cuore è controllata da:

Canali del calcio di tipo L (LCCs)

Recettori per la rianodina (RyRs)

Giuntofilingina-2 (JHP2)

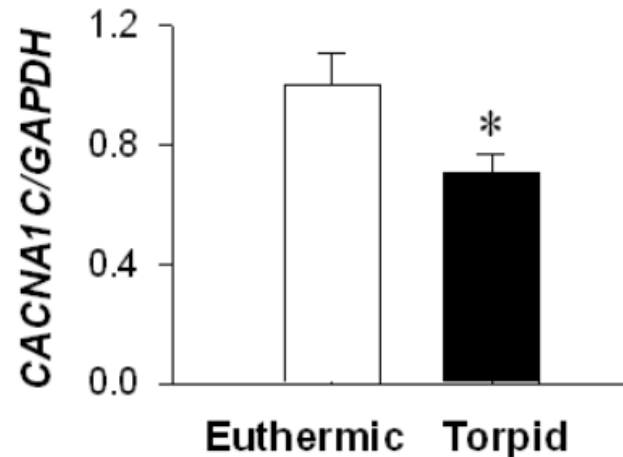
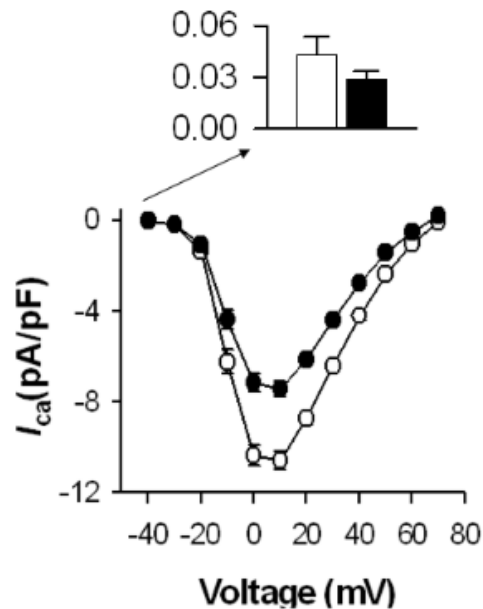
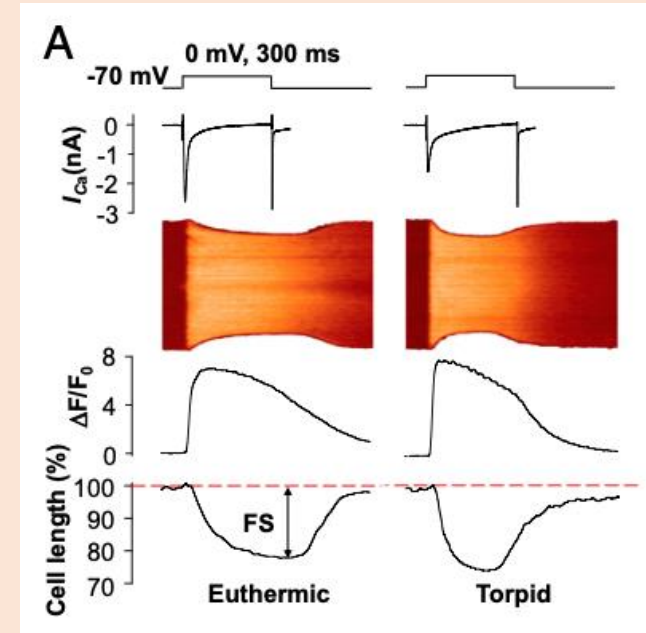
Caveolina 3 (CAV3)

Serum response factor (SRF)

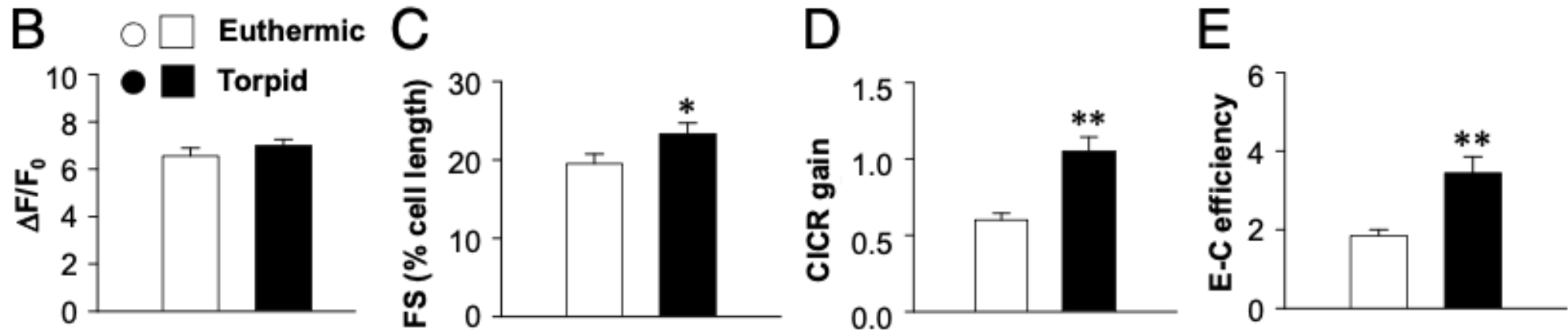
Miocardina

LCC-RYR

I ricercatori hanno osservato i livelli di Ca^{2+} intracellulare transiente innescato da I_{Ca} durante una depolarizzazione da -70 mV a 0 mV in cardiomiociti isolati ventricolari.

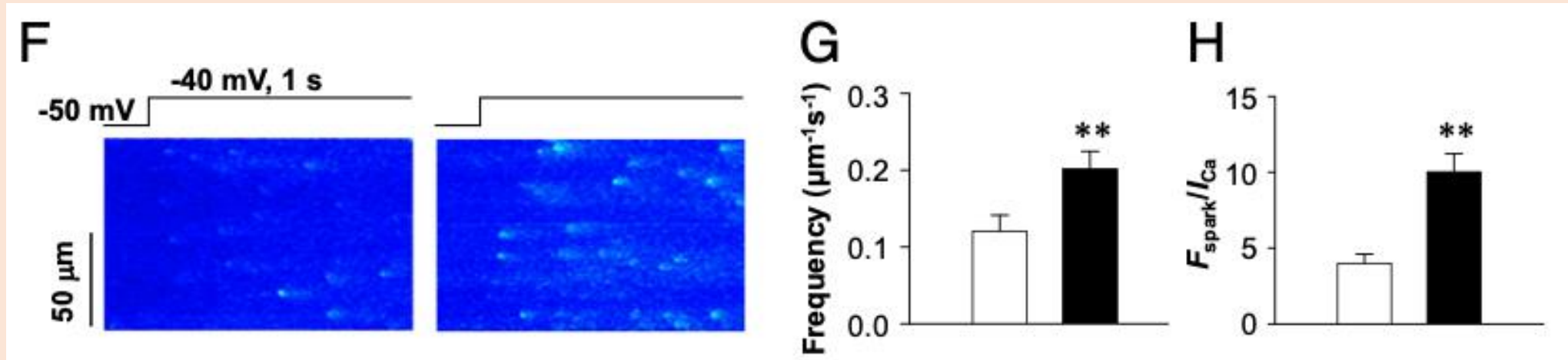


La densità di I_{Ca} e l'espressione di LCC significativamente minore nel gruppo *torpid*.



il transitorio di Ca^{2+} (B) e la contrazione cellulare (C) innescati dalla diminuzione di I_{Ca} erano paragonabili o addirittura superiori a quelli del gruppo eutermico, determinando un aumento vicino al 100% del guadagno CICR (D) ed efficienza di accoppiamento E-C (E).

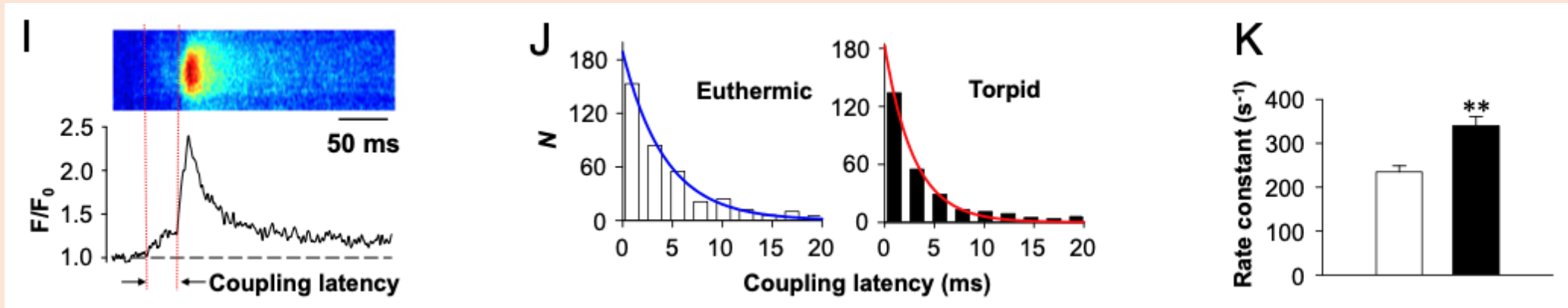
Esp 1



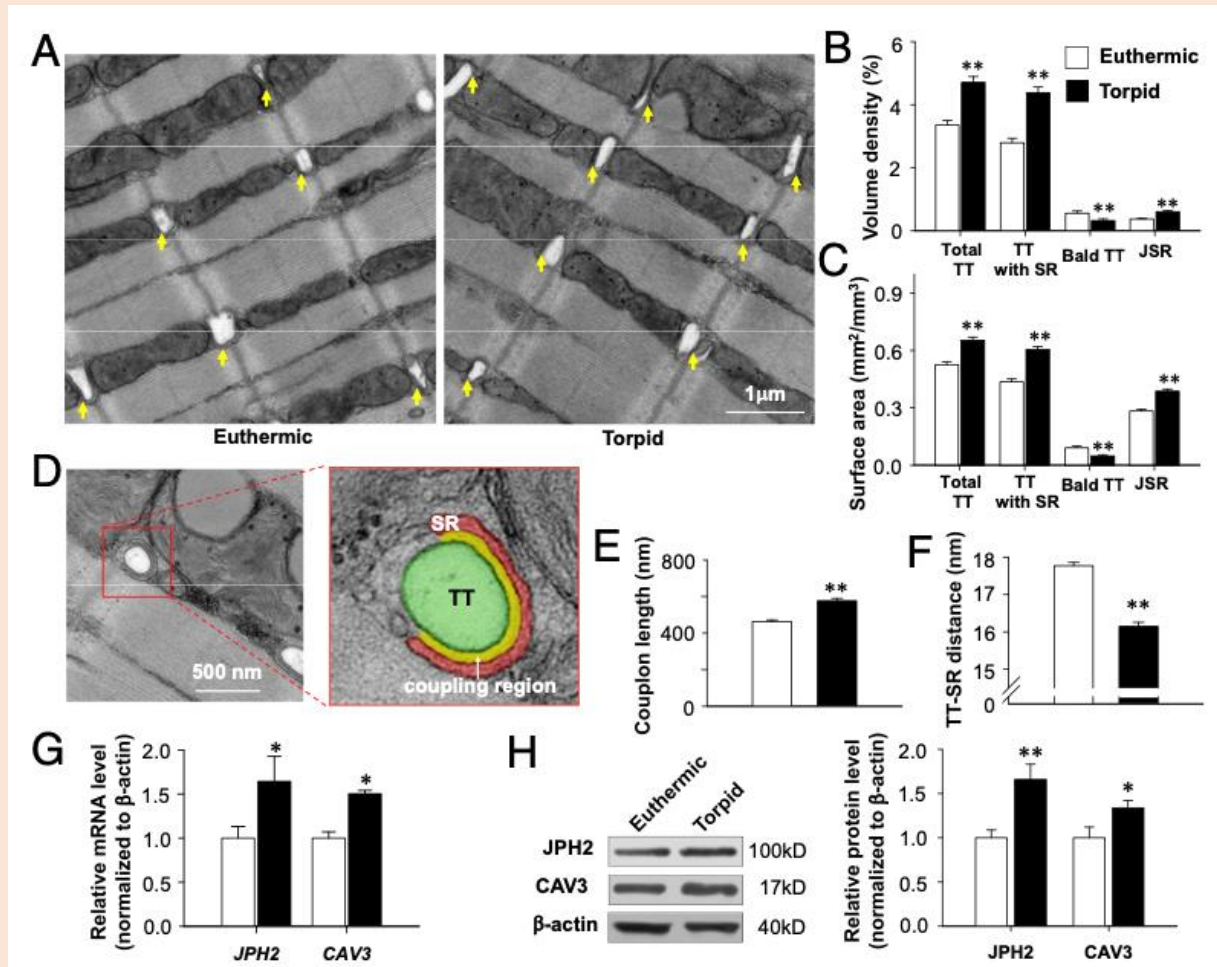
La frequenza di scarica di Ca^{2+} è maggiore nel *torpid group* (G).

l' I_{Ca} a -40 mV era inferiore nel gruppo torpido, determinato dall'adattamento di Boltzmann delle curve di tensione I_{Ca} , la fedeltà per LCC per attivare RyR, definita come F_{spark} per unità I_{Ca} ($F_{\text{spark}}/I_{\text{Ca}}$), aumentato del 150% durante l'ibernazione (Fig. 1H).

ESP 2



- Singoli LCC e innescato *spark* di Ca^{2+} da RyR (I).
- Abbiamo misurato la cinetica di segnalazione LCC-RyR misurando la latenza dall'inizio di una *spark* LCC (J).
- La costante di velocità della segnalazione LCC-RyR è aumentata da $235 \pm 14 s^{-1}$ nel gruppo eutermico a $340 \pm 21 s^{-1}$ nel gruppo torpido (K), indicando che i RyR sono diventati più reattivi ai *trigger* di Ca^{2+} durante l'ibernazione.



- Densità del volume aumentata del 57,2% (B).
- Area superficiale dei TT aumentata del 39,2% (C).
- La *couplon length* è aumentata del 25% (E).
- la distanza TT-SR è stata ridotta da $17,76 \pm 0,09$ nm nello stato eutermico a $16,15 \pm 0,11$ nm nello stato torpido (F).
- La riduzione di 1,6 nm significa che le molecole LCC e RyR erano >40% più vicine durante il letargo.

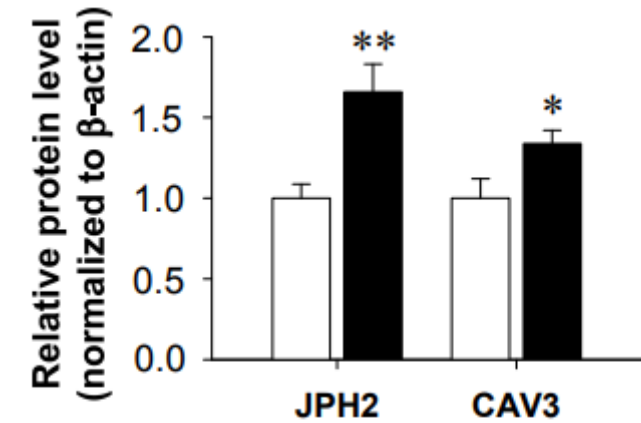
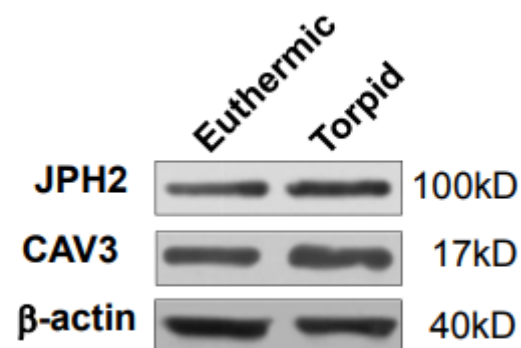
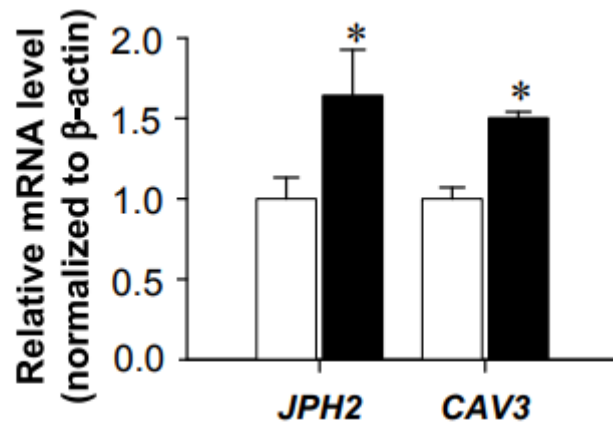
L'aumento dell'area del *couplon* e la diminuzione della distanza LCC-RyR migliorano l'efficienza della segnalazione LCC-RyR.

Aumento dell'espressione di JPH2 e CAV3 durante l'ibernazione

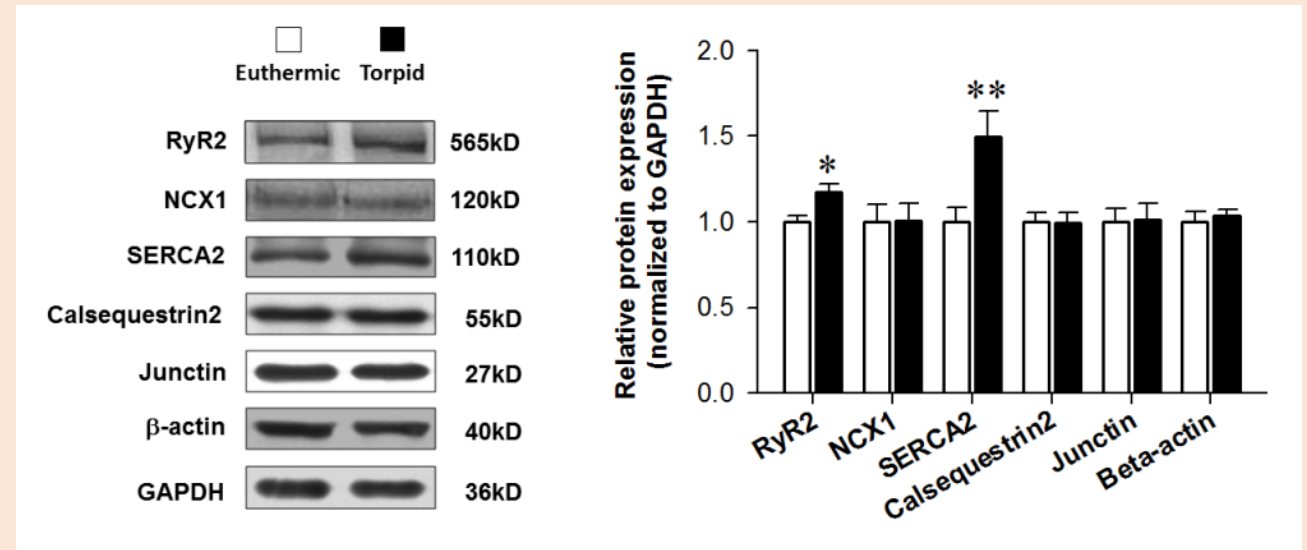
Interazione JPH2-CAV3 mantiene accoppiamento LCC-RyR
Determinazione dei livelli di JPH2 e CAV3

Metodi: **qPCR** e **western blot**

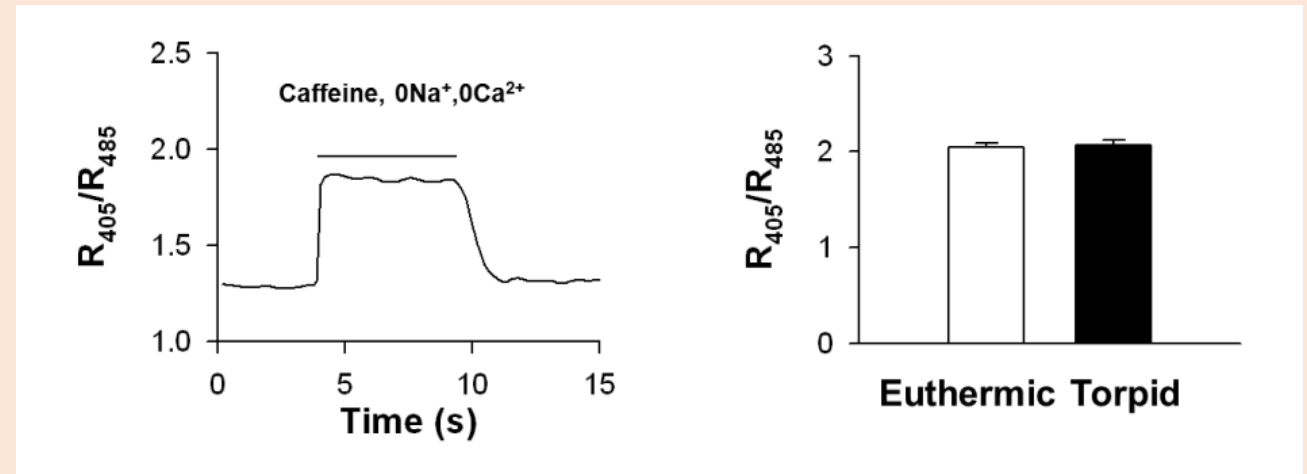
- espressione JPH2 significativamente upregolata sia mRNA sia proteina **JPH2: appare il miglior candidato all'aumento di efficienza del signaling intermolecolare Ca^{2+} durante l'ibernazione;**
- espressione CAV3 significativamente upregolata



- upregolazione SERCA2 e RyR, mentre l'espressione di altre proteine del macchinario E-C rimane inalterata (NCX1, calsequestrina, junctina,...)

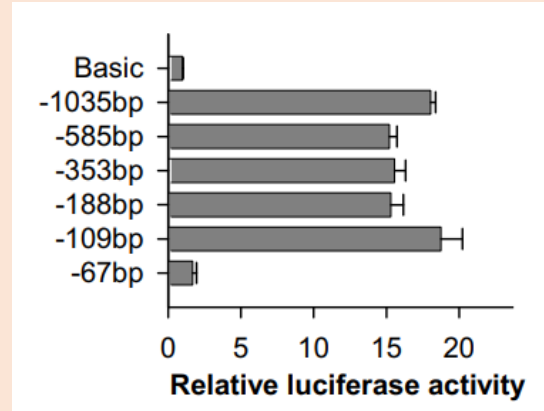
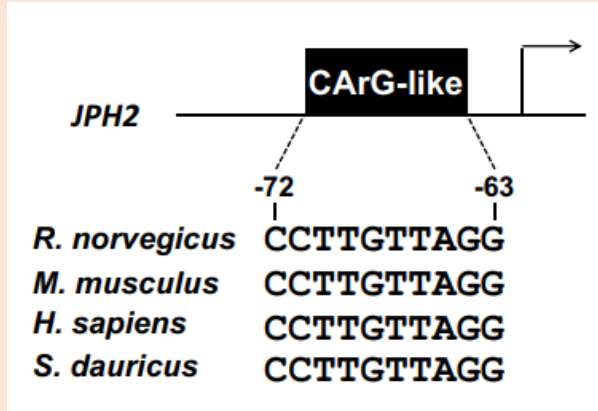


L'aumento RyR è marginale; l'aumento di SERCA2 può spiegare l'osservata accelerazione di uptake Ca^{2+} , ma il profilo della curva del Ca^{2+} resta invariato tra i due stati fisiologici



Meccanismi di trascrizione di JPH2

Regolazione trascrizionale JPH2 come principale determinante dell'efficienza CICR

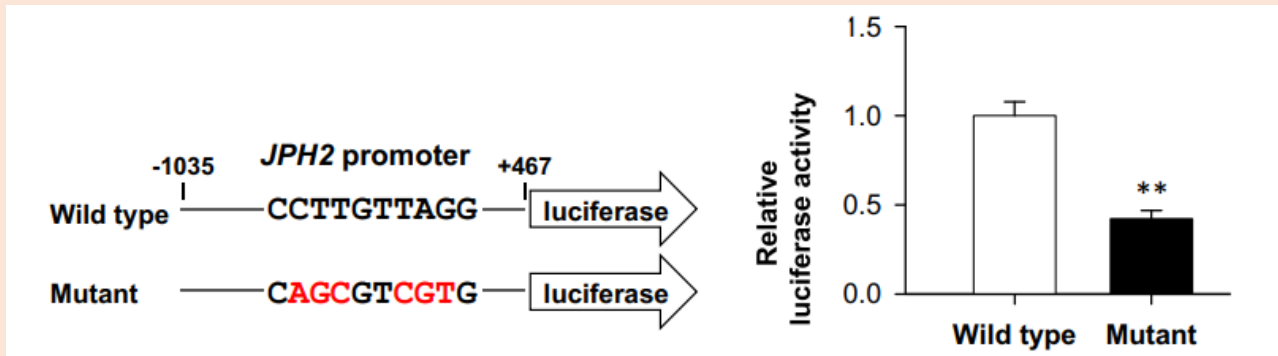


- Comparazione sequenze JPH2 tra scoiattolo, ratto, topo e uomo

Identificata una regione ~1 kb upstream al sito di inizio della traduzione

- **Clonaggio in plasmidi reporter luc** della regione/frammenti

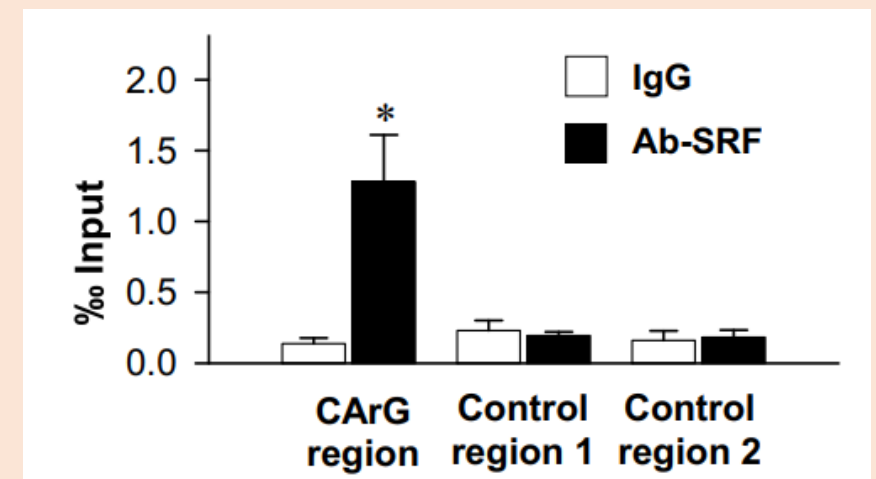
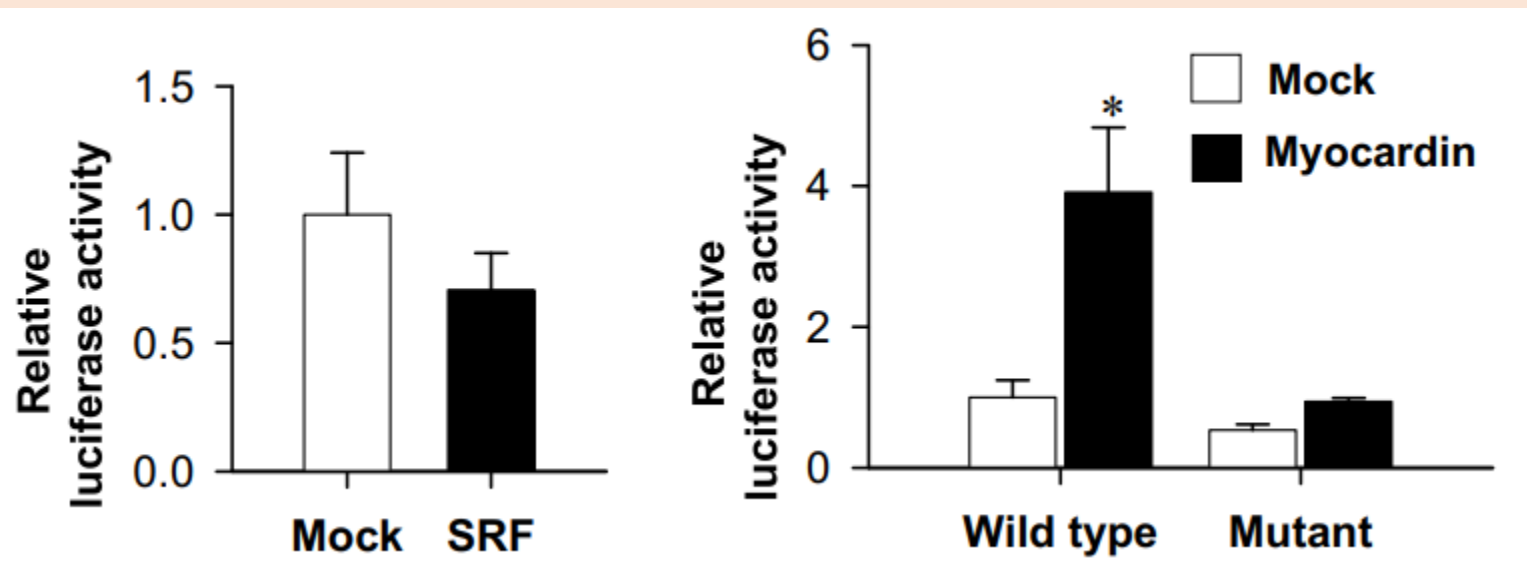
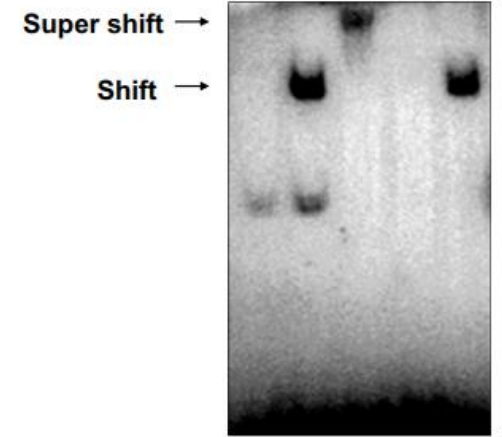
Individuata CArG-like -109, -67 in cui mutazioni/delezioni alterano drammaticamente l'attività del promotore JPH2 in cardiomiociti neonati



CArG-like è un elemento di regolazione in cis al gene

- SRF+miocardina legano CArG-like nel tessuto cardiaco:
 - SRF lega specificamente la sequenza (**EMSA, Chip-qPCR**) riconoscendo elemento SRE nel promotore
 - miocardina aumenta 4X attività promotore → è il **fattore limitante della trascrizione** in complesso con SRF e **co-attivatore tessuto-specifico di SRF (cotrasfezione)**

Labeled DNA	+	+	+	+	+
Mock nuclear protein	+	-	-	-	-
SRF nuclear protein	-	+	+	+	+
SRF antibody	-	-	+	-	-
Unlabeled DNA	-	-	-	+	-
Mutant unlabeled DNA	-	-	-	-	+

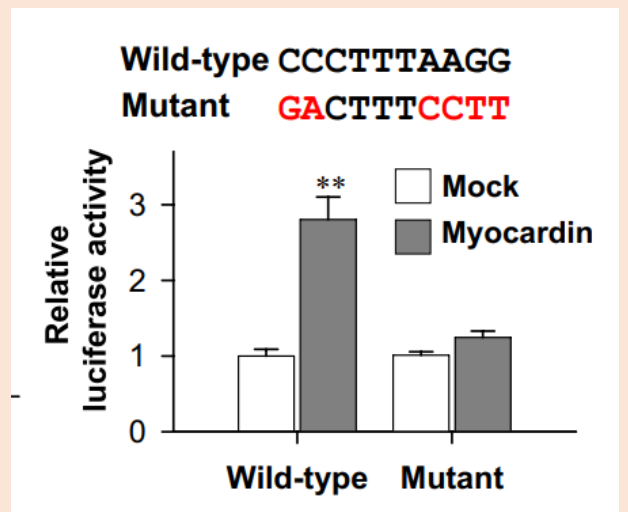
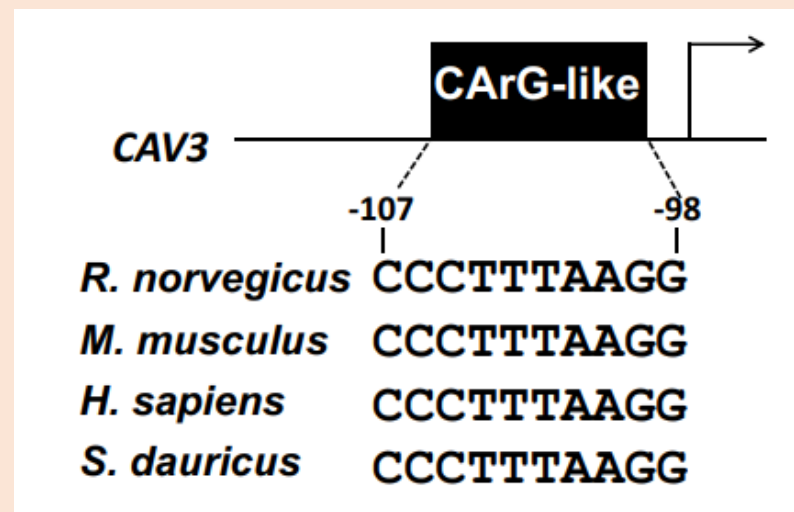
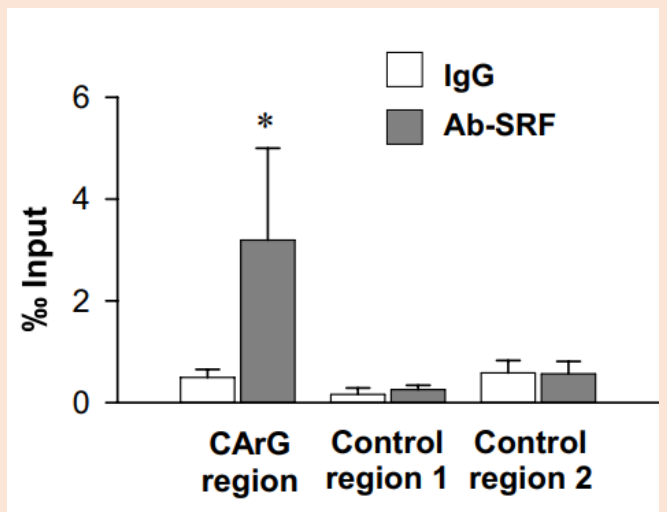


Miocardina regola la trascrizione concertata di CAV3 e JPH2

Identificazione di CArG-like altamente conservato anche in CAV3

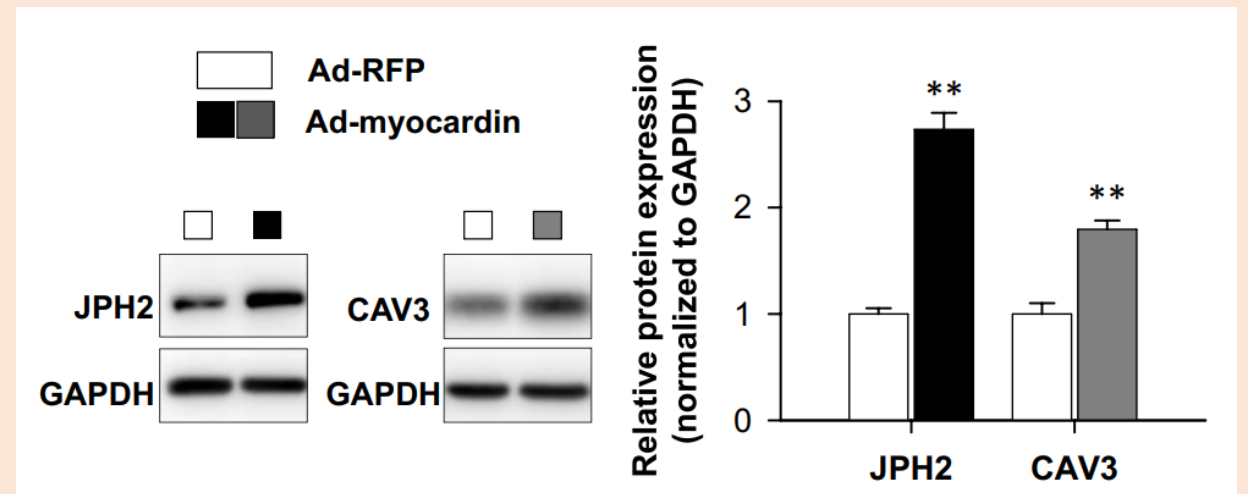
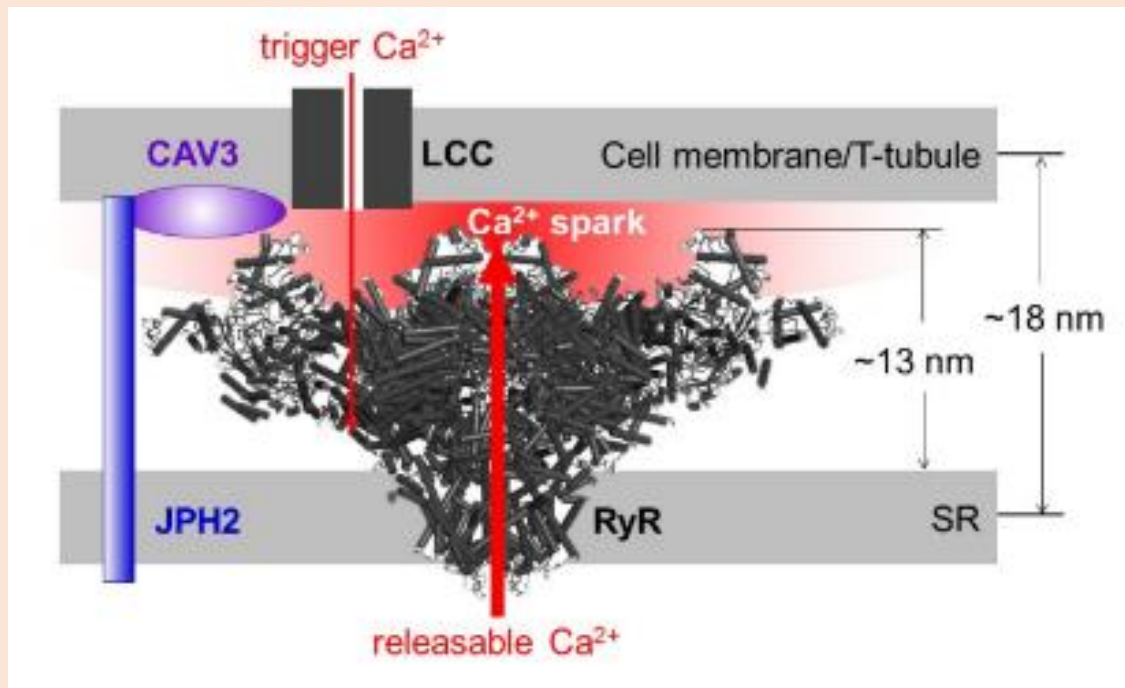
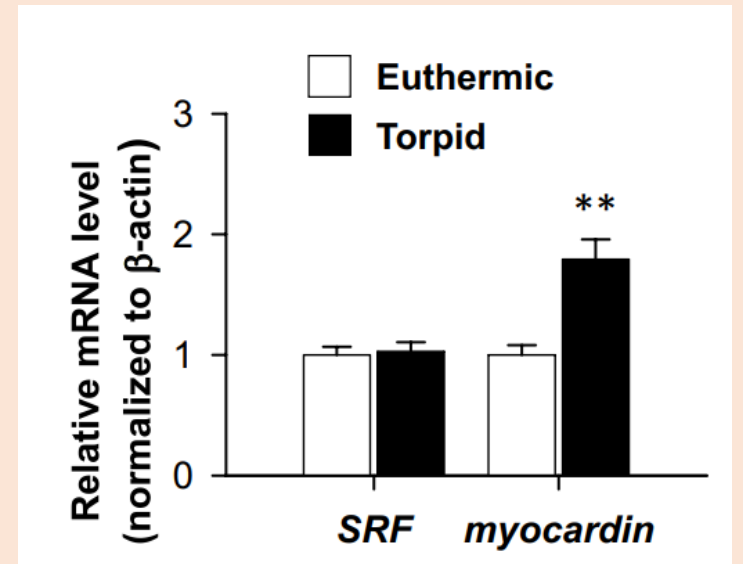
Accumulo specifico di SRF anche nel locus CAV3: è presente un elemento CArG-like (**ChIP-qPCR**)

- SRF-miocardina regola trascrizione CAV3 (mutazione CArG-like)



CAV3 e JPH2 sono accoppiati sia strutturalmente (*couplon*) sia dal punto di vista dell'espressione genica CAV3/JPH2 e miocardina aumentano espressione in ibernazione, ma non SRF

- Overespressione miocardina in cardiomiociti neonatali → aumento espressione CAV2 e JPH2

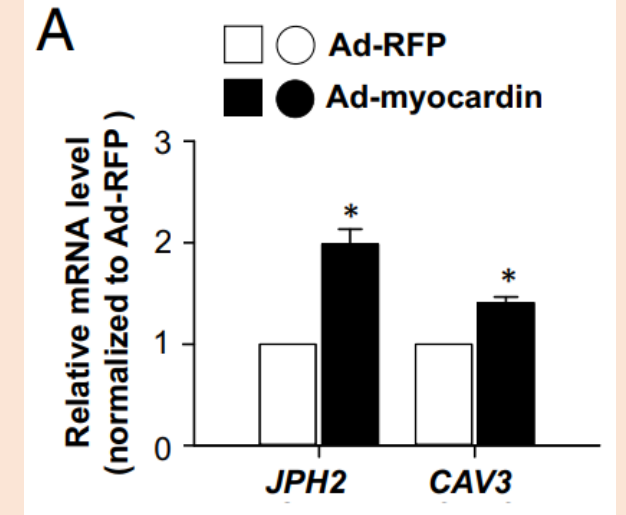
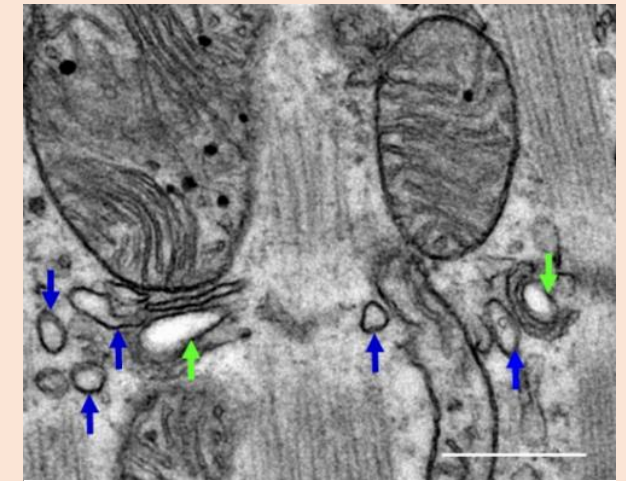
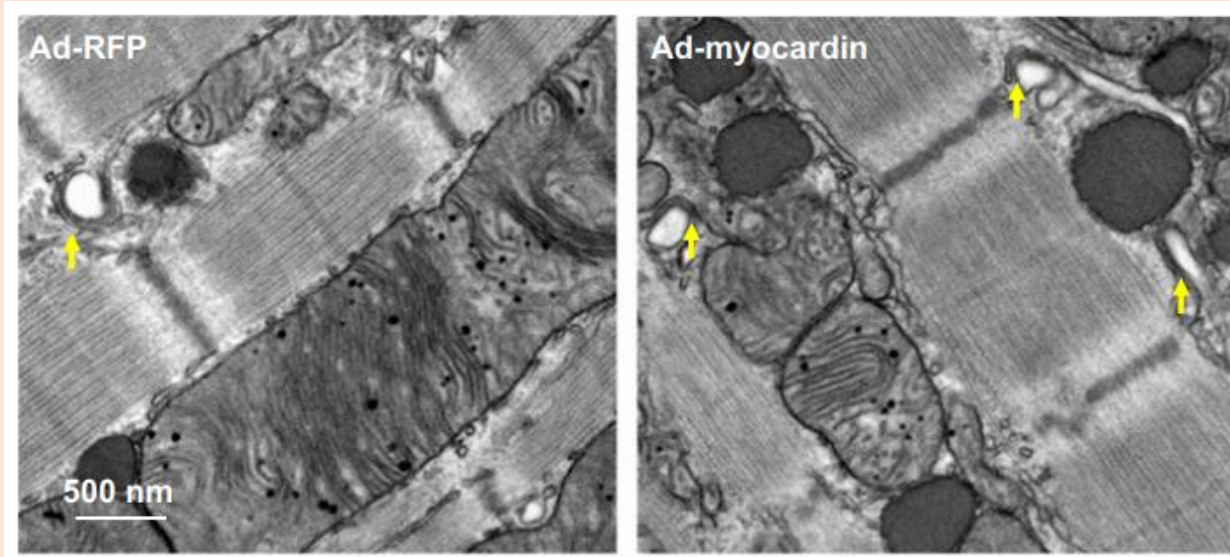


Miocardina si conferma il fattore limitante della trascrizione di CAV2 e JPH2

La sovra-espressione di miocardina riproduce i cambiamenti nel signaling LCC-RyR dell'ibernazione

Valutazione del ruolo causativo di miocardina nel riprodurre assetto molecolare del signaling *torpid* in scoiattoli eutermici

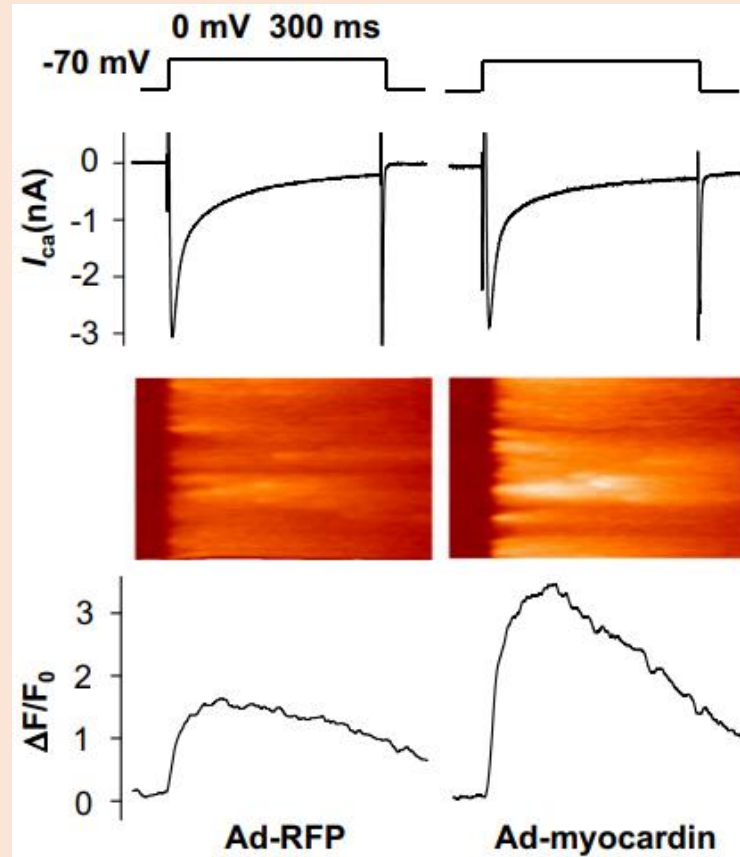
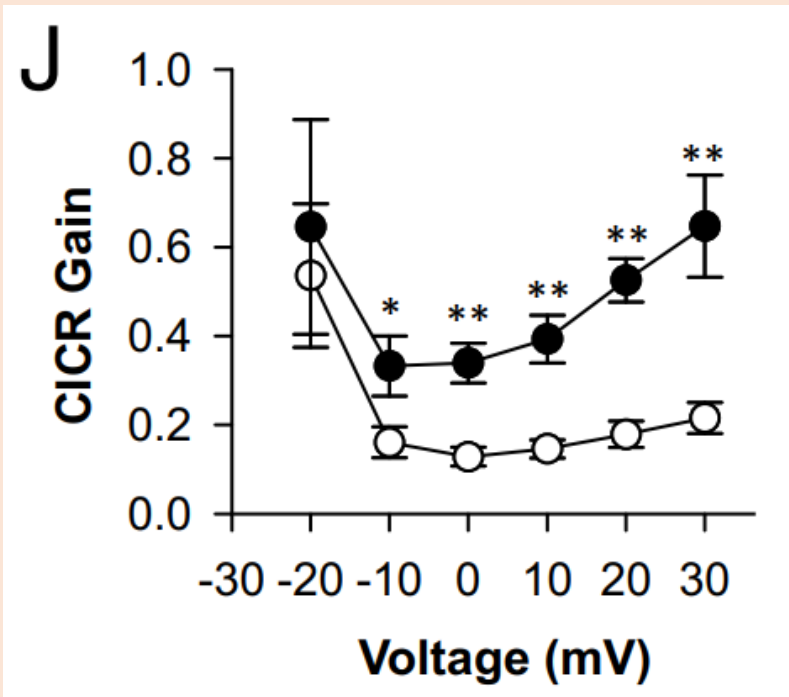
- **Infezione con adenovirus** di miocardina in scoiattoli eutermici: upregolazione CAV3 e JPH2 e aumento densità ed estensione superficiale di TT-SR (**TEM**)



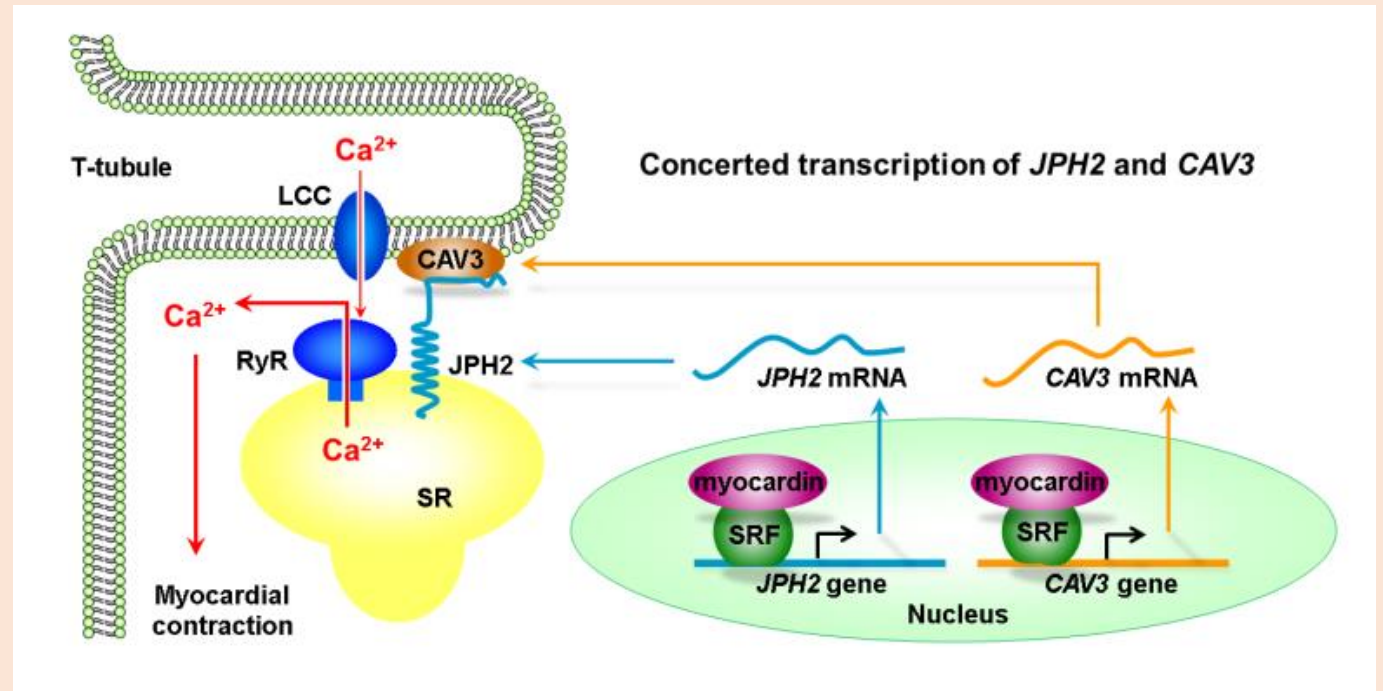
L'interfaccia TT-SR aumenta di lunghezza e diminuisce la distanza tra le due membrane

Si è osservato che la miocardina complementa la degradazione dei TT-SR in coltura – rescue parziale alla degradazione dei ***couplon***

- Densità I_{Ca} inalterata, ma aumento dell'ampiezza Ca^{2+} transiente del 49%: **aumento efficienza CICR** in termini di ampiezza/unità I_{Ca} (**whole-cell patch clamp**)



DISCUSSIONE



Negli scoiattoli in ibernazione avviene un aumento di espressione di JPH2 e CAV3
→ TT-SR si stringe e facilita comunicazione LCC-RyR

La regolazione positiva di questi geni è affidata a SRF-miocardina e avviene in modo concertato per mantenere la stechiometria dell'interazione

La miocardina è lo switch principale nell'aggiustamento del tono del Ca^{2+} cardiaco (+ altri livelli di regolazione post-trascrizionale e post-traduzionale per JPH2)

L'evoluzione dei mammiferi ha ottimizzato la biochimica e la termodinamica dei processi fisiologici a 37°C → alta sensibilità ai ΔT

Maggiore sensibilità della contrazione cardiaca: il freddo aumenta la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (tossico!)

→ animali che ibernano hanno dovuto evolvere **sistemi che mantengono bassa $[\text{Ca}^{2+}]$** e allo stesso tempo una **robusta corrente Ca^{2+} transiente per garantire il battito cardiaco:**

-**diminuzione corrente LCC:** limita durata pda e rischio accumulo/aritmia

-**aumento efficienza LCC-RyR:** asse miocardina-giuntofina

-**upregolazione SERCA:** rapido rilassamento Ca^{2+}

→ OTTIMIZZAZIONE OMEOSTASI Ca^{2+} E CONTRAZIONE CARDIACA

Questo meccanismo rappresenta il «gain of function» dello speculare «loss of function» osservato nella patologia cardiaca:

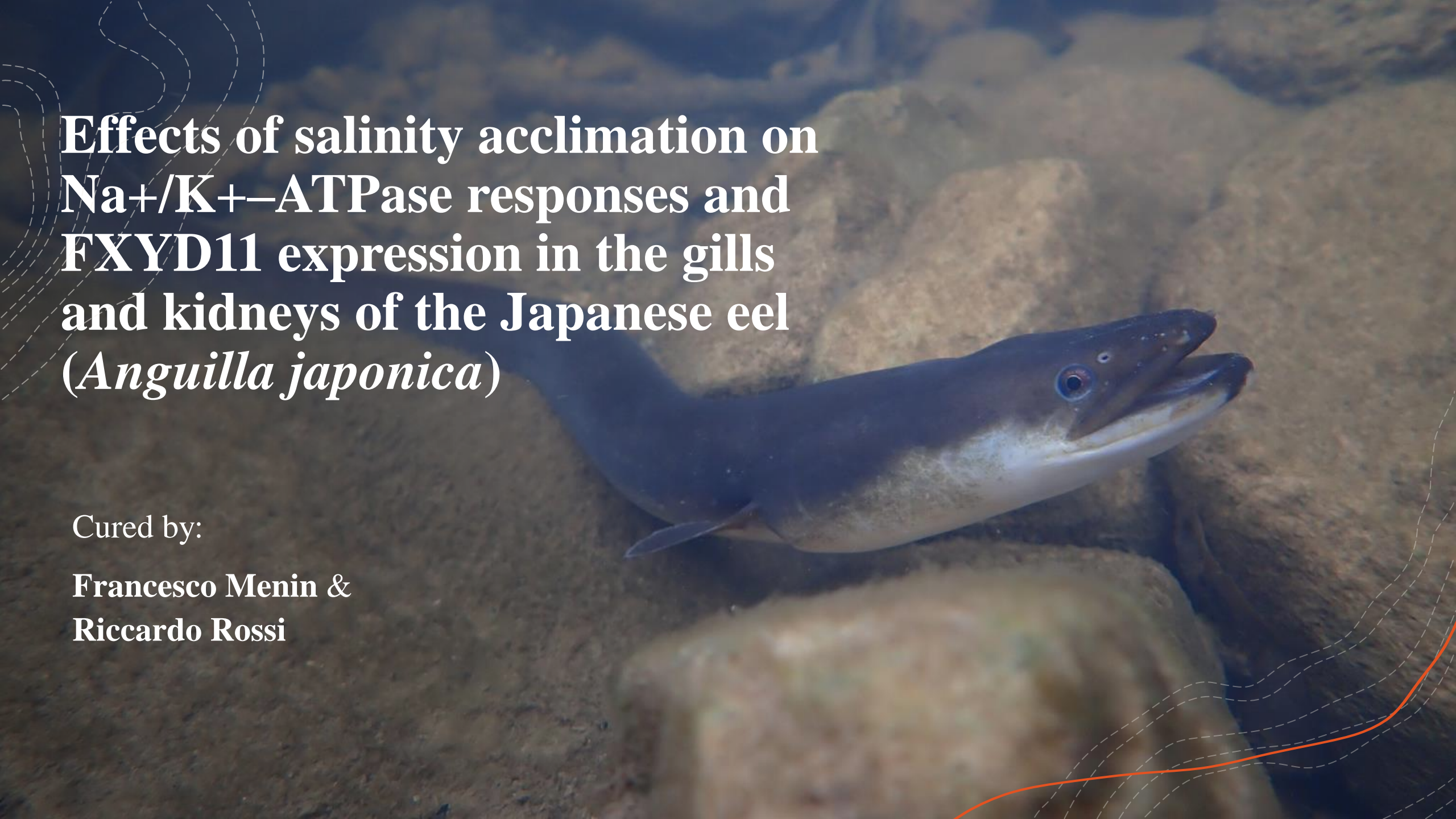
Rete TT alterata e ritratta → RyR orfano, cala SERCA e aumenta NCX1

Rilevanza medica non solo per questa specularità ma anche perché l'ibernazione è reversibile

Possibile applicazione del macchinario SRF-miocardina per revertire il disaccoppiamento eccitazione-contrazione nei cardiomiociti in insufficienza cardiaca

Grazie per l'attenzione



A Japanese eel (Anguilla japonica) is shown swimming in shallow water over a rocky bottom. The eel is dark blue on top and lighter on the bottom, with its mouth slightly open. The background consists of large, light-colored rocks and a sandy bottom. The overall scene is dimly lit, suggesting an underwater environment.

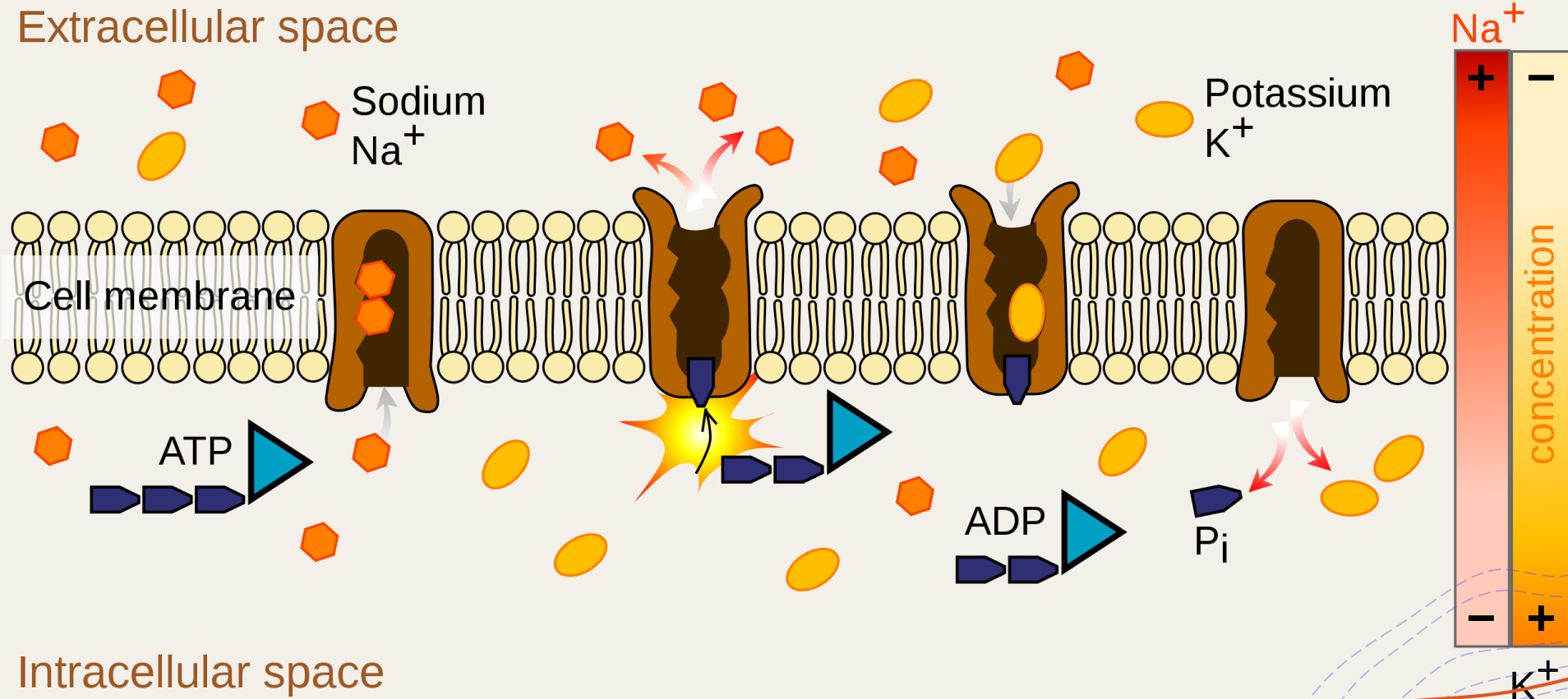
**Effects of salinity acclimation on
Na⁺/K⁺-ATPase responses and
FXD11 expression in the gills
and kidneys of the Japanese eel
(*Anguilla japonica*)**

Cured by:

**Francesco Menin &
Riccardo Rossi**

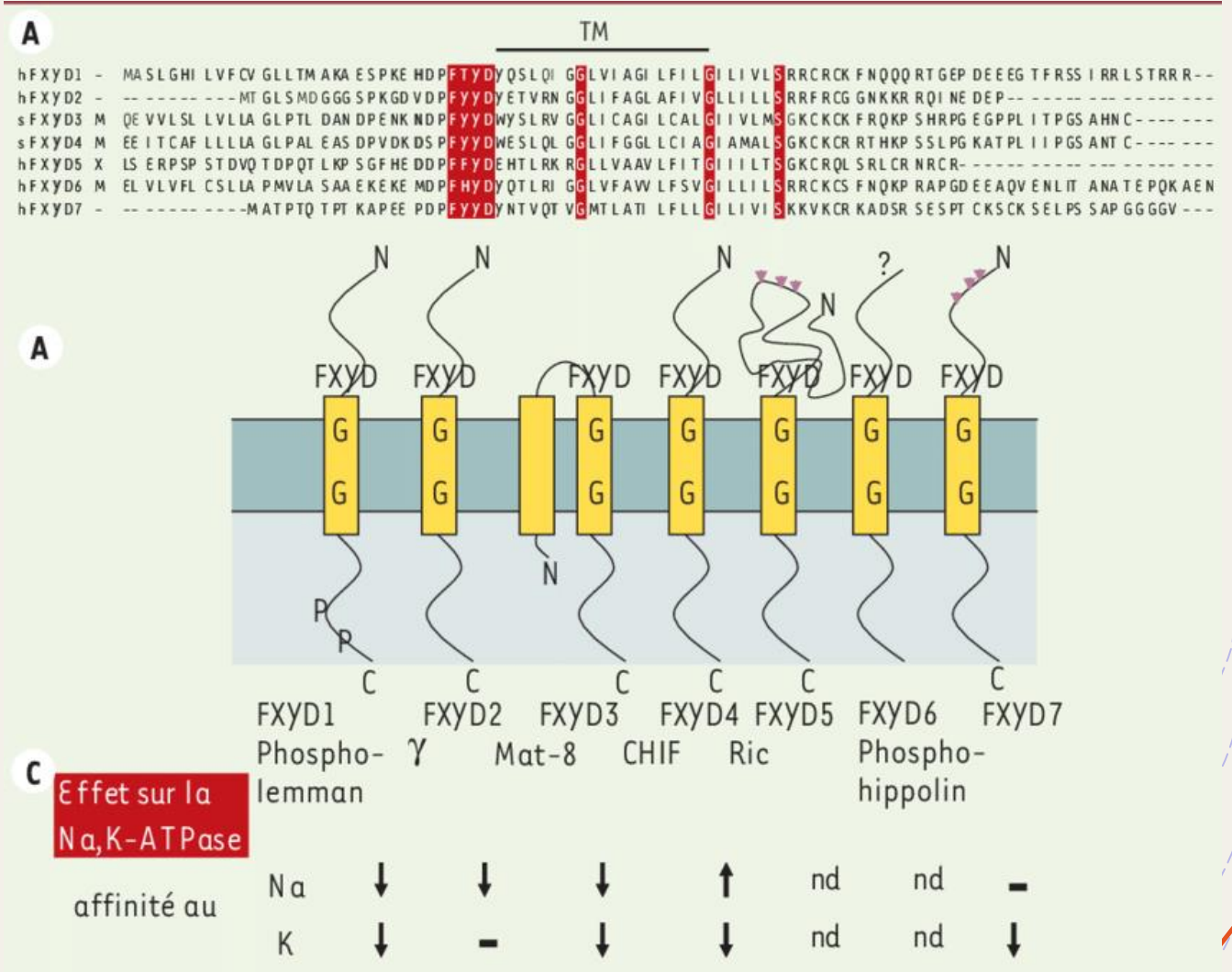
Introduction: Na/K pump (NKA)

- Essential protein for most of living beings
- Important also for osmoregulatory processes
- Changes in NKA activity and expression occur in the osmoregulatory organs when confronted with changes in environmental salinity



Introduction: Na/K pump (NKA)

- Regulated by FXYD protein family
- FXYD binds and modulate NKA activity
- Few studies in FXYD roles in fishes
- Regulation of FXYD by corticosteroids



Introduction: model

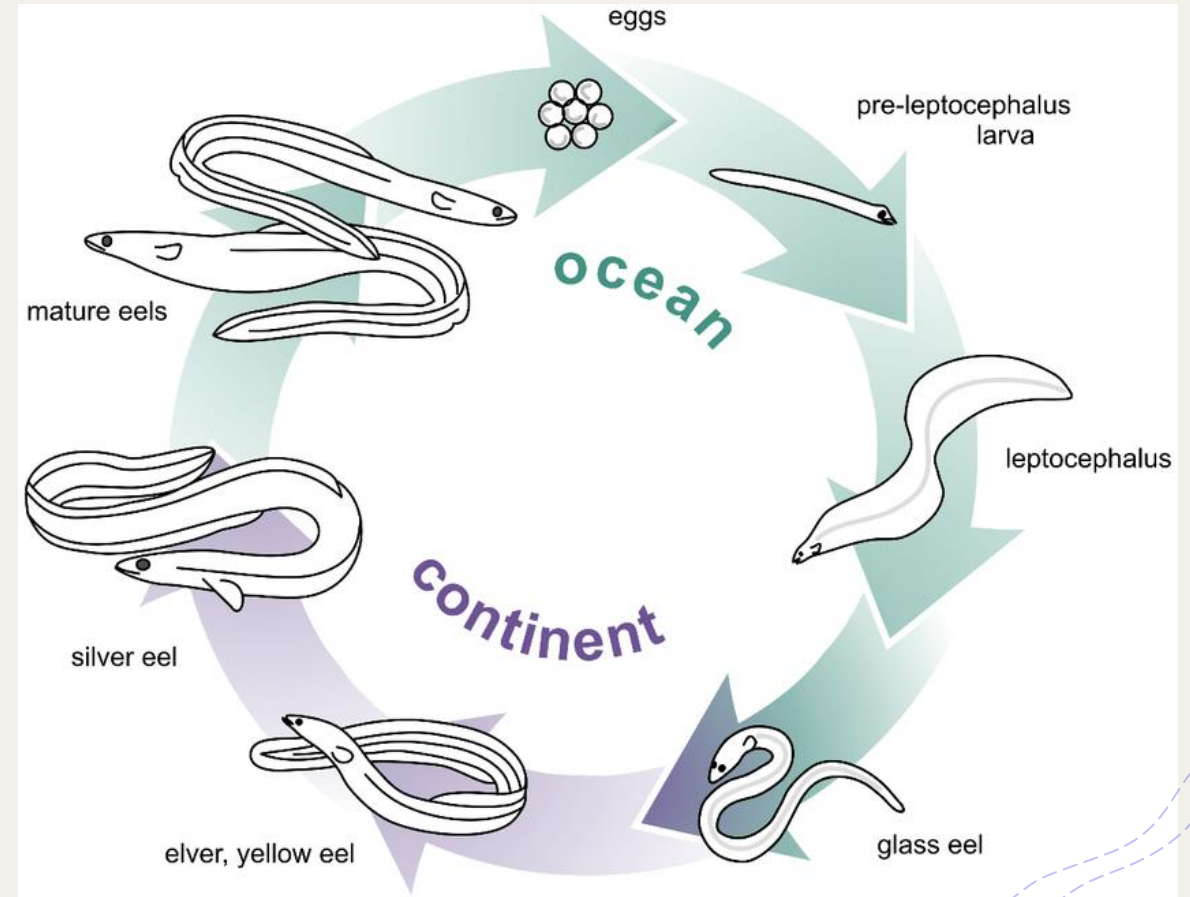
To better understand the role of NKA in changes of external salinity, researchers chose as model the yellow japanese eel (*Anguilla japonica*), an highly farmed catadromous fish.



Introduction: model

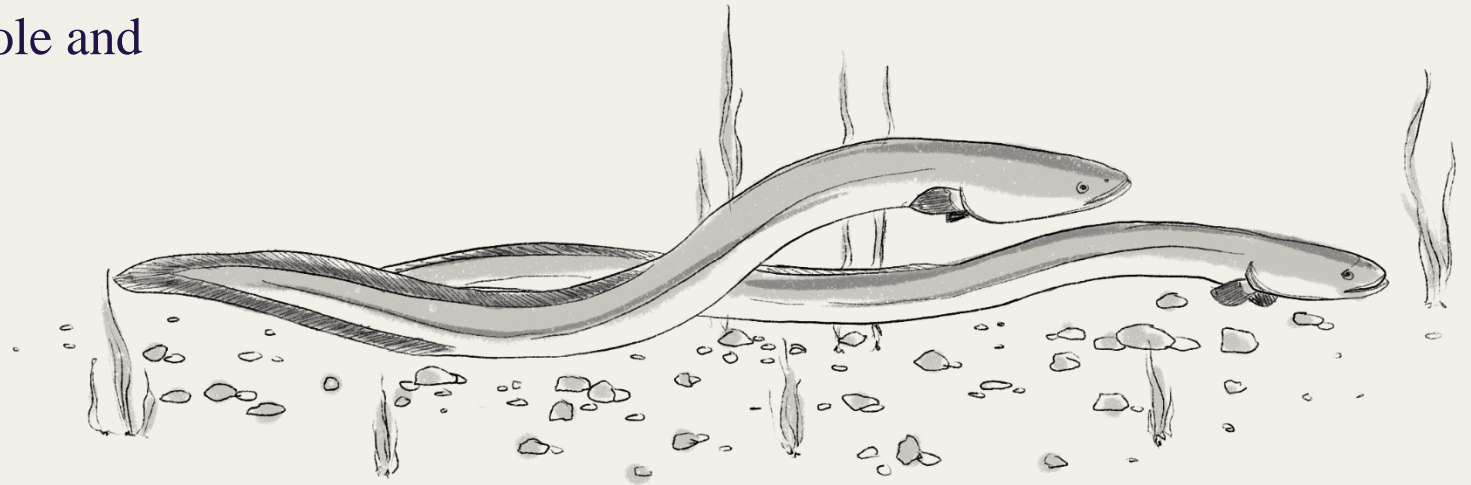
Catadromous fishes life cycle:

- Reproduction in sea waters
- Migration to fresh waters
- Growth in fresh waters
- Migration to salt waters



Aims

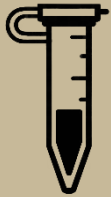
This study aims to better understand the expression and activity of NKA in *Anguilla japonica* with different environmental salinity conditions, underlying also the role and regulation of FXRD



Materials and methods



+Fish maintenance and sampling



+FXVD analysis processes (cloning, PCRs)



+Preparing crude membrane fractions (gills, kidney)



+Choosing antibodies and performing immunoblotting

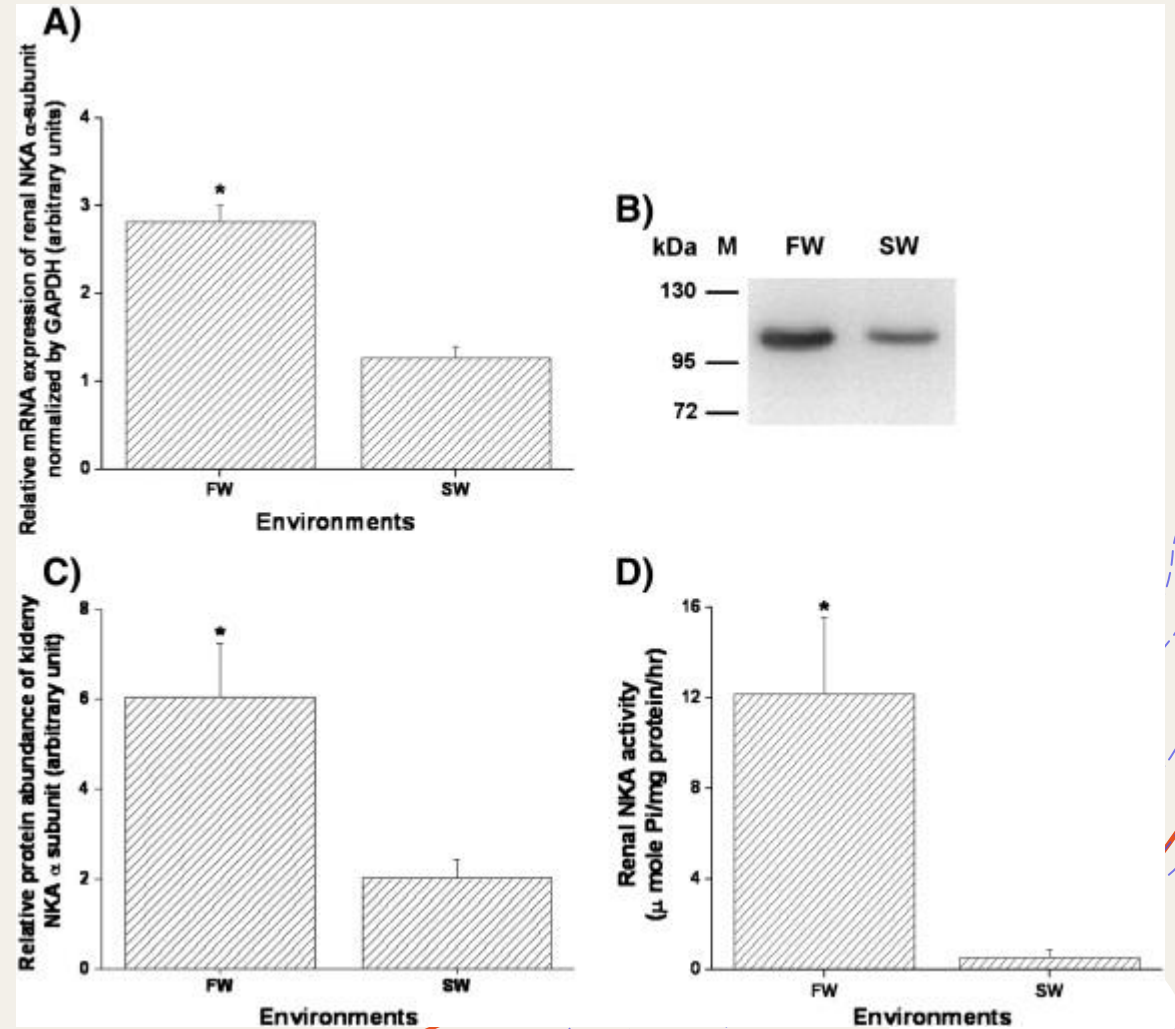
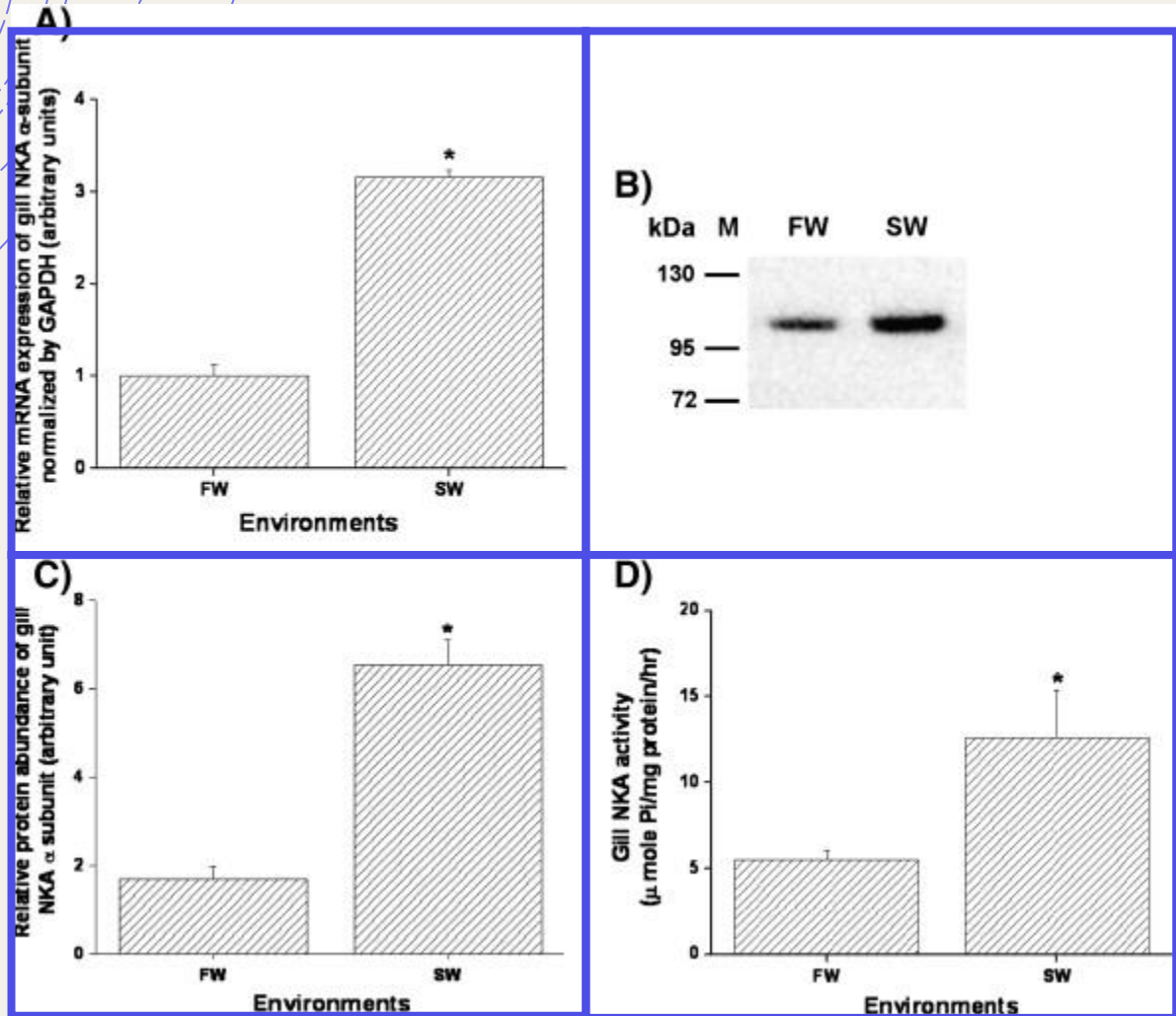


+Measuring specific activity of NKA

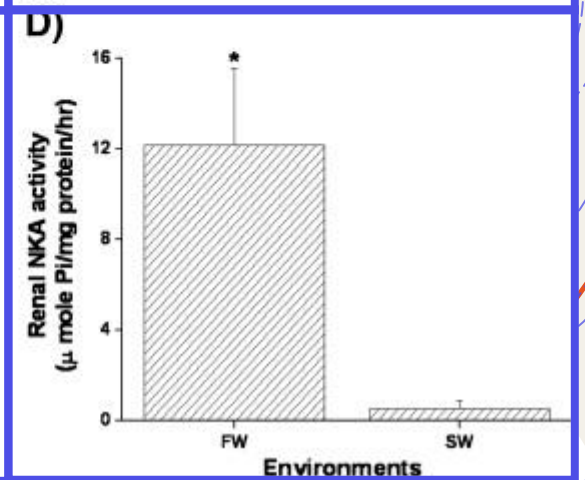
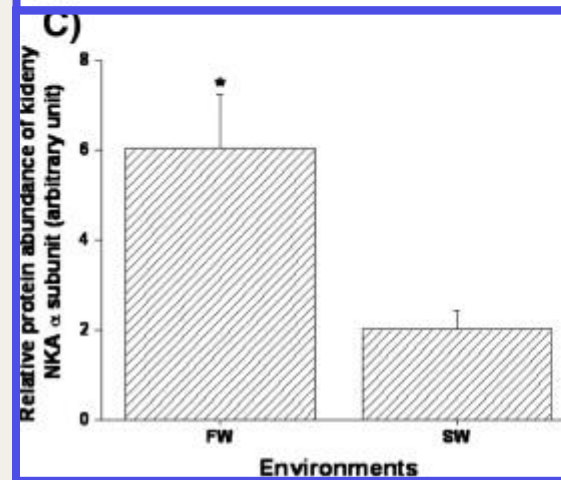
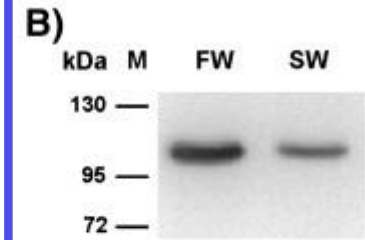
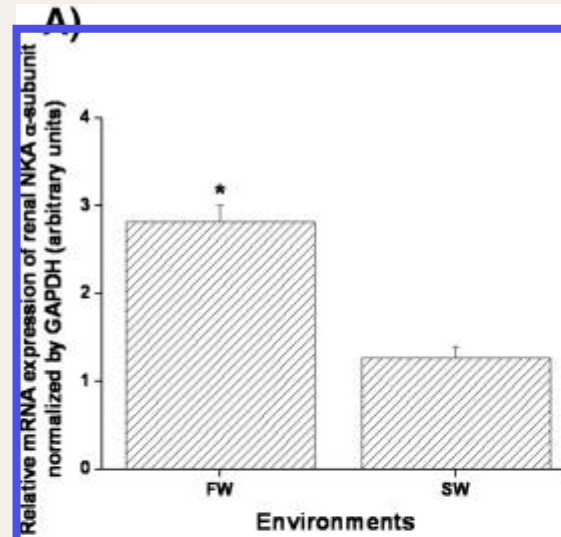
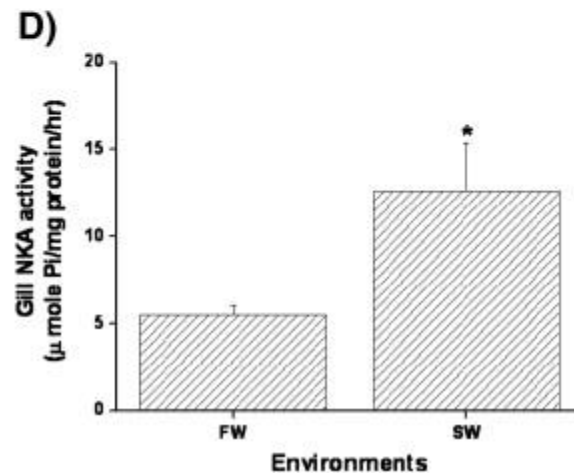
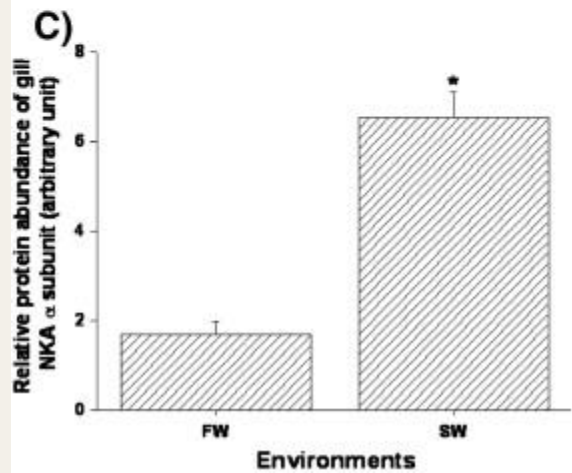
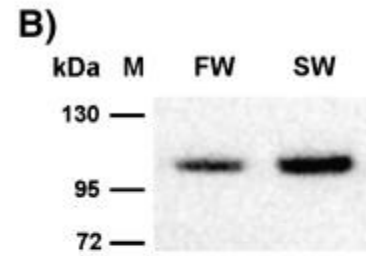
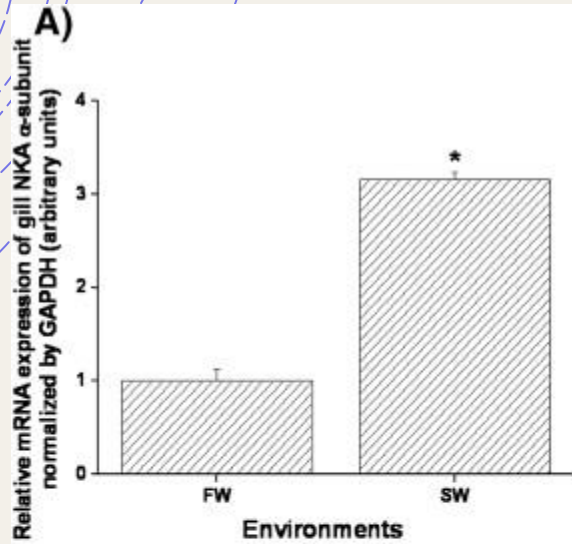


+Organ culture in vitro and analysis

Results and discussion



Results and discussion



Results and discussion

A

hFXyD1 - MASLGHI LVFCV GLLTMAKA ESPKE HDPF**FTYD**YQSLQI **GG**LVIAGI LFI L**GI**LIVL**S**RRRCCK FNQQQ RTGEP DEEEG TFRSS I RRLSTRR R--
hFXyD2 - ---MT GLSMDGGG SPKGDVDP**FYYD**YETVRN **GG**LIFAGL AFIV**GL**LL**S**RRFRCG GNKKR RQI NE DEP---
sFXyD3 M QE VVLSL LVLLA GLPTL DANDPENKNDP**FYYD**WYSLRV **GG**LICAGI LCAL**GI**I**V**LM**S**GKCKCK FRQKP SHRPG EG PPL ITPGS AHNC---
sFXyD4 M EEITCAF LLLA GLPAL EASDPVDKDS**FYYD**WESLQL **GG**LIFGGL LCI A**GI**AMAL**S**GKCKCR RTHKP SSLPG KATPL IIPGS ANT C---
hFXyD5 X LSERPSP STDVQTDPQT LKPSGFHEDDP**FYYD**EHTLRK **RG**LLVAAV LFIT**GI**I**I**L**T****S**GKCRQL SRLCR NRCR---
hFXyD6 M ELVLVFL CSLA PMVLA SAAEKEKEMDP**FHYD**YQTLRI **GG**LVFAW LFSV**GI**LL**L****S**RRCKCS FNQKP RAPGDEEAQVENLIT ANATEPQKAEN
hFXyD7 - ---MATPTQTPT KAPEE PDP**FYYD**YNTVQT **VG**MTLATI LFL**L****GI**LIV**I****S**KKVKCR KADSR SESPT CKSCK SELPS SAPGGGV---

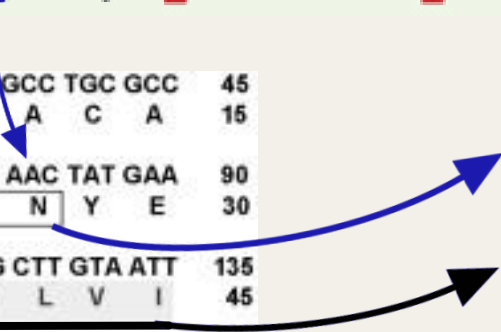
TM

```

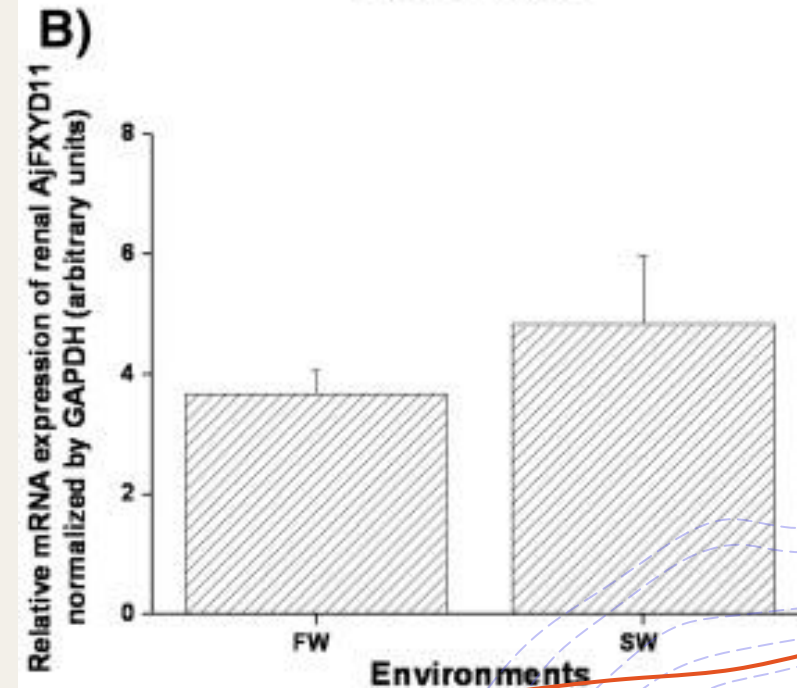
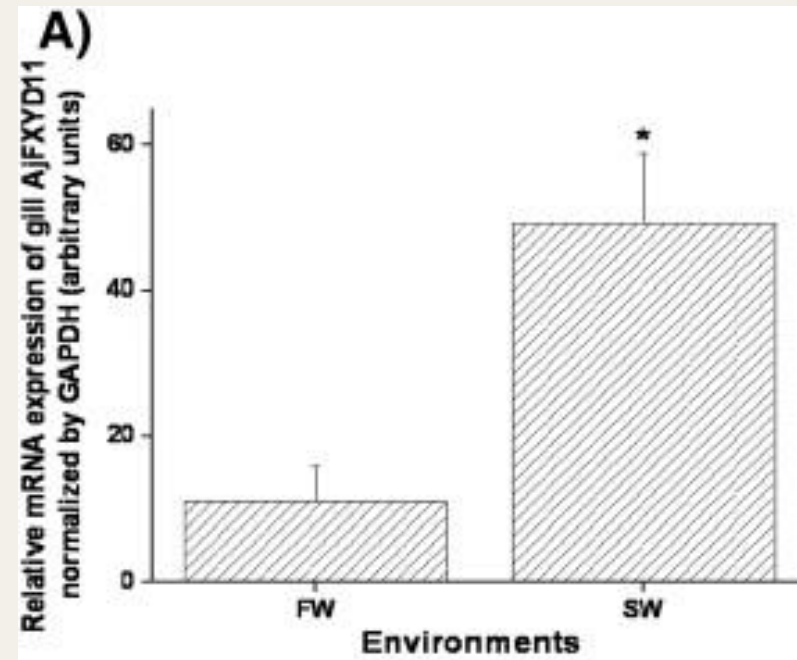
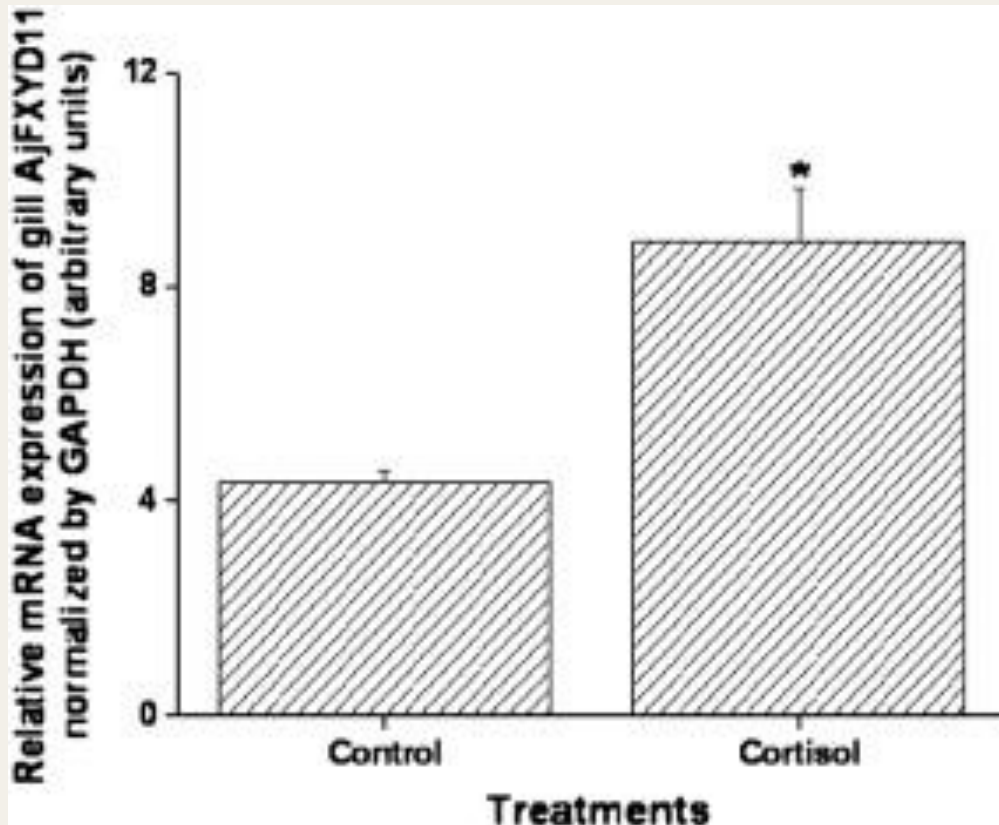
1 ATG GGA CAG TTT TCT GCT CTG GTT CTT TTG GCA GTT GCC TGC GCC 45
1 M G Q F S A L V L L A V A C A 15
46 TTC TTC ACT GAA GCC GAA GCA AAC CCA TTT GTT TAC AAC TAT GAA 90
16 F F T E A E A N P F V Y N Y E 30
91 AGG CTA CGA ATT GGA GGC TTG GTC TTC ACA TGT TTG CTT GTA ATT 135
31 R L R I G G L V F T C L L V I 45
136 GGC GGA GTA ACC TTA CTT TTG TGG AAC AGA TGC AAA AGA GGA ACC 180
46 G G V T L L L W N R C K R G T 60
181 GAA AAA GAT AAG GAC AAT TCA AGT AAC ATC TAG 213
61 E K D K D N S S N I
    
```

FXyD domain

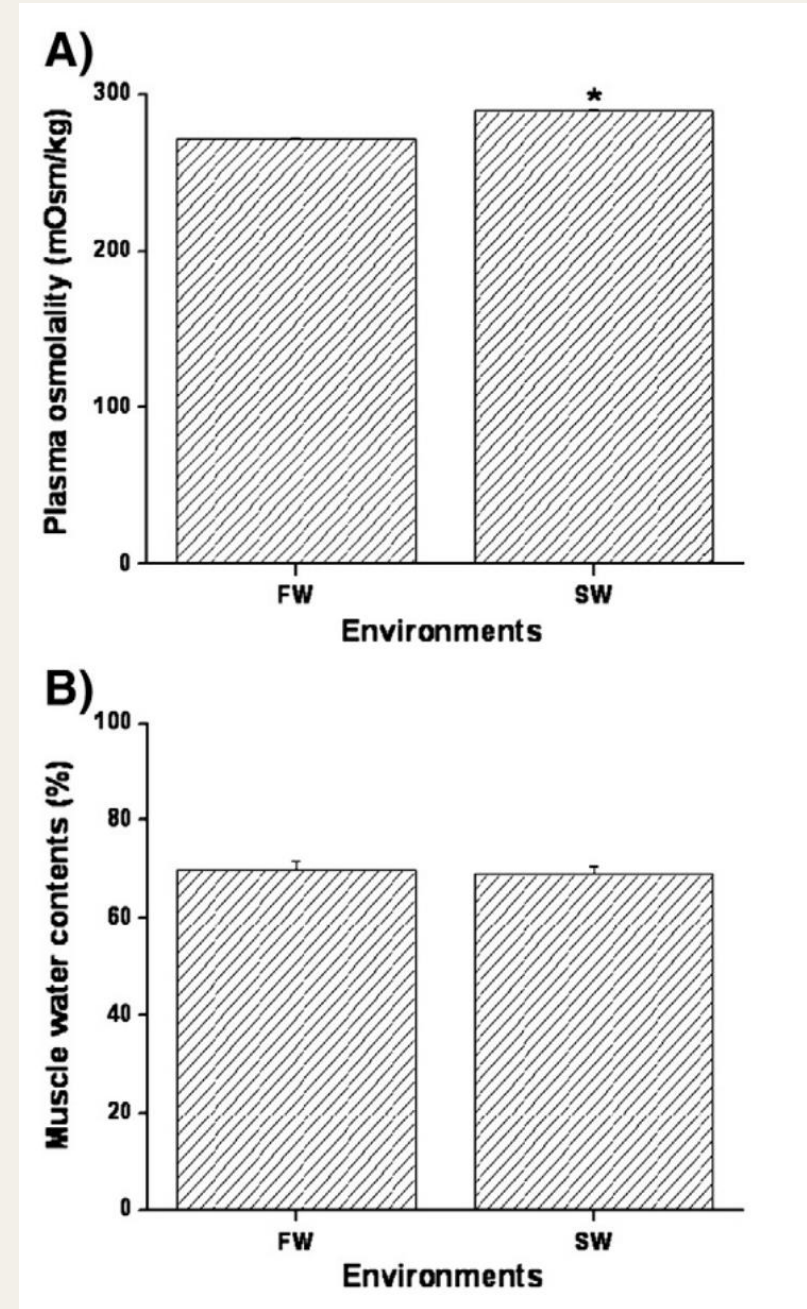
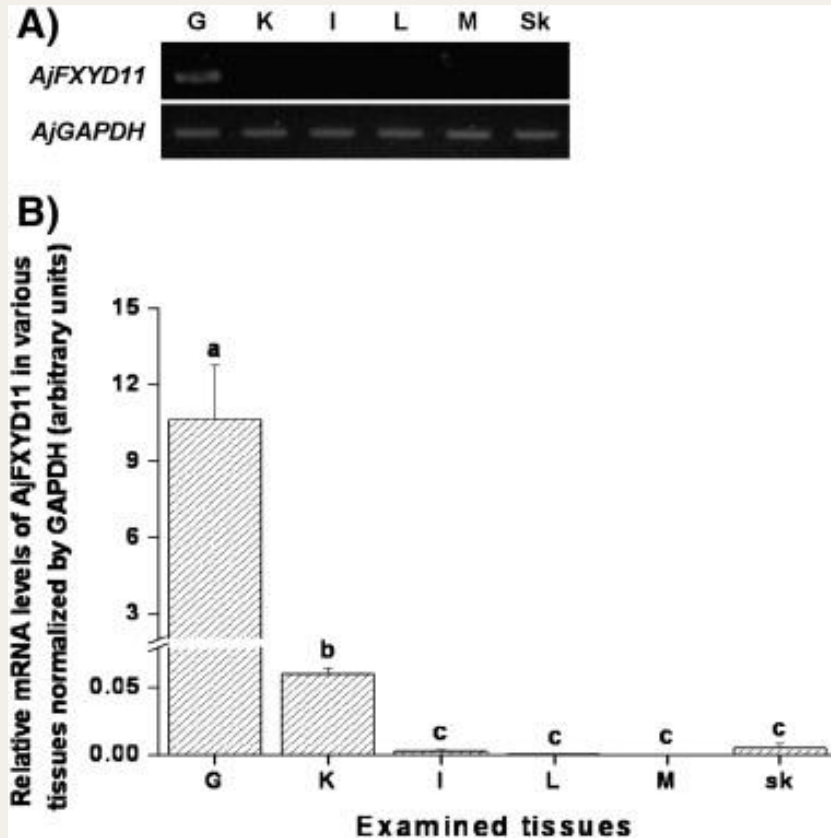
Transmembran domain



Results and discussion



Results and discussion



Thanks for
watching!

