

MTA Doktori Értekezés tézisei

Az ioncsatorna-enzim határmezsgye: egyedi CFTR és TRPM2 csatornák szerkezete, működése

**Dr. Csanády László**

Semmelweis Egyetem

Orvosi Biokémiai Intézet

Budapest

2014

1. A KITŰZÖTT KUTATÁSI FELADAT ÖSSZEFOGLALÁSA

A humán genom projektnek köszönhetően az emberi szervezetet alkotó fehérjék szekvenciája ismertté vált, és e fehérjék jelentős részének élettani, illetve kóros folyamatokban játszott szerepéről is vannak ismereteink. Számos kórkép esetén tudjuk, hogy mely fehérje működésének befolyásolása – serkentése vagy gátlása – lenne terápiás szempontból előnyös. Az ilyen célzott, molekuláris terápia kifejlesztését nagymértékben segíti a célfehérje szerkezetének, működésének pontos ismerete.

Az ioncsatornák olyan speciális transzmembrán fehérjék, amelyek egy (vagy néhány) adott ionfajta szelektív transzportjára képesek, pórusukat pedig különféle szabályozó szignálok nyitják/zárják. Működésük közvetlen eredménye a biológiai membránok időben változó ion-permeabilitása, illetve a transzmembrán iontranszport. Az ioncsatornák elengedhetetlenek többek között a membránpotenciál, az idegi ingerületvezetés, szinaptikus ingerületátvitel, szív- és vázizomműködés, érzékelés, különböző hámfelszíneken keresztüli víz- és sófelszívódás illetve kiválasztás, hormonszekréció, immunsejt aktiváció, és még sok más élettani folyamat létrejöttében. Élettani szerepük mellett több száz betegség ismeretes, amelyek hátterében valamely ioncsatorna működészavara áll.

Az ioncsatornák transzport aktivitása természeténél fogva elektrogén, ami egyedülálló lehetőséget biztosít e fehérjék konformációváltozásainak egyedi, molekuláris szintű tanulmányozására. Az utóbbi évtizedben e nagyfelbontású funkcionális vizsgálatok egyre inkább támaszkodhatnak a növekvő számú atomi felbontású fehérje térszerkezetekre is. Kutatócsoportunk az orvosi szempontból jelentős, saját enzimatisz aktivitással is rendelkező, CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) és TRPM2 (Transient Receptor Potential Melastatin 2) ioncsatornák szerkezet-funkció vizsgálatában vesz részt. Célunk e két ioncsatorna térszerkezetének, illetve molekuláris működési mechanizmusának pontos feltérképezése.

Kísérletes kutatásaink mellett elméleti fejlesztőmunkát is végzünk, amelynek célja az egyedi ioncsatorna áramok kinetikai elemzésének, modellek illesztésének és statisztikai rangsorolásának tökéletesítése, illetve e módszerek alkalmazási körének bővítése.

2. IRODALMI HÁTTÉR

2.1 A CFTR klorid csatorna

CFTR kutatás végső célja a cisztikus fibrózisban (CF), illetve szekréciós hasmenésben (pl. kolera) szenvedő betegek gyógyítása. A CF, amelyet a CFTR csatorna működészavara okoz, a leggyakoribb öröklődő halálos betegség a fehér lakosság körében. A jelenleg gyógyíthatatlan komplex betegséget a tüdő, bélcsatorna, hasnyálmirigy, és verejtékmirigyek hámrétegeinek felborult só-víz egyensúlya jellemzi; a javuló tüneti kezelések ellenére a betegek várható élettartama ma is csak ~30 év. Másrészt, a fejlődő országokban még ma is gyakori szekréciós hasmenéseket a CFTR bakteriális toxinok okozta túlműködése idézi elő, amely a bélcsatornán keresztüli nagymértékű só-vízvesztéshez vezet.

Számtalan öröklött mutáció okozhatja a CFTR csökkent működését. A leggyakoribb CF allél ($\Delta F508$, >70%) a fehérje érését zavarja meg, így kevés CFTR fehérje jut el a sejtfelszínre. A legtöbb CF mutáció azonban (a $\Delta F508$ is) emellett súlyosan károsítja a csatorna működését is, csökkentve a pórus nyitvatartási valószínűségét. A CF kutatás távlati célkitűzései az érési zavar kiküszöbölése, és a funkció javítása. Ezzel szemben a szekréciós hasmenéseket a CFTR szelektív gátlása oldaná meg.

A CFTR az ABC (ATP Binding Cassette) fehérjecsaládba tartozik, ennek megfelelően polipeptid lánc két homológ félből épül fel, amelyeket egy-egy transzmembrán domén (TMD) és intracelluláris nukleotidkötő domén (NBD) alkot; e két felet egyetlen intracelluláris regulációs (R) domén köti össze. Az R-domént a ciklikus AMP dependens proteinkináz (proteinkináz A, PKA) számos helyen foszforilálja, defoszforilált állapotban a csatorna inaktív. A CFTR pórus kapuzását a két NBD által katalizált ATP-hasítási ciklus hajtja. ATP megkötését követően a két NBD dimert képez, amely két ATP molekulát zár magába. Mindkét ATP kötőhelyhez mindkét NBD hozzájárul: az egyik a konzervált Walker A és B motívumokat, a másik a konzervált ABC signature szekvenciát szolgáltatja. A CFTR esetén az "1-es" kötőhely (NBD1 Walker A/B + NBD2 signature) katalitikusan inaktív, csak a 2-es kötőhely (NBD2 Walker A/B + NBD1 signature) aktív ATPáz. A csatorna pórusát az NBD1/NBD2 dimer kialakulása nyitja, a záródás az ATP elhasítását követi.

Az ABC fehérjecsalád többi tagjai is rendkívül fontosak orvosi szempontból: alapvető szerepet játszanak a gyógyszerek felszívódóképességének, szöveti eloszlásának meghatározásában, tumor kemoterápia során túlzott kifejeződésük multidrog rezisztenciához vezet. Ezen felül több örökletes betegség kötődik ABC fehérjék mutációihoz. Az egyedi csatornás mérések óriási felbontóképessége miatt a CFTR, mint egyedüli ion csatorna a családban, modellként szolgál a többi, nehezebben vizsgálható ABC fehérjével közös alapvető mechanizmusok tanulmányozására. A CFTR kutatása ezért hasznos lehet a gyógyszerek felszívódása, szöveti eloszlásának javítása, vagy a daganatbetegekben fellépő multidrog rezisztencia leküzdése szempontjából is.

2.2. A TRPM2 kation csatorna

A TRPM2 a TRP fehérje család tagja, amely agyi idegsejtekben, csontvelőben, fagocitákban, a pankreász β -sejtjeiben és szívizomsejtekben alkot oxidatív stresszre aktiválódó Ca^{2+} -permeábilis nem-szelektív kation csatornákat. A kórokozókkal érintkező fagocitákban termelődő reaktív oxigén származékok (ROS) aktiválják a TRPM2 csatornákat, s az ezeken beömlő Ca^{2+} hozzájárul a kemotaxis és a citokintermelés kiváltásához. A pankreász β -sejtjeiben a TRPM2 aktivitás segíti a glükóz-kiváltotta inzulin-szekréciót, kiegészítve az ATP-szenzitív K^+ (K_{ATP}) csatornákhöz kötődő klasszikus útvonalat; TRPM2 knock-out egerekben emelkedett a nyugalmi vércukorszint, és csökkent a glükóz tolerancia.

A TRPM2 aktivitása számos patológias folyamathoz is köthető, amelyek apoptózishoz vezetnek. Agy és szívizom iszkémiát követő reperfüziója ROS termelést vált ki; a következőképpen aktiválódó TRPM2 csatornákon beömlő Ca^{2+} sejthalált okoz. Az oxidatív stressz és a TRPM2 neurodegeneratív betegségeken, pl. Alzheimer-kórban, is szerepet játszik. Ugyanakkor, amiotrófiás laterálszklerózisban, Parkinson demenciában, és bipoláris zavarban szenvedő betegekből izolált TRPM2 mutációk arra utalnak, hogy a csökkent TRPM2 működés is betegséghez vezethet. A granulocita-aktivációban betöltött szerepe miatt a TRPM2 a krónikus gyulladások kezelésében, az inzulin szekréció serkentése révén pedig a cukorbetegség és a kongenitális hiperinzulinizmus kezelésében is ígéretes terápia célpont.

A TRPM2 homotetramer; alegységeit hat transzmembrán α -hélix, egy tetramerizációért felelős coiled-coil régió, és egy intracelluláris NUDT9-H domén alkotja; ez utóbbi 50%-ban homológ a mitochondriális NUDT9 enzimmel amely ADP-ribózt (ADPR) hasít AMP-re és ribóz-5-foszfátra ("ADPRáz"). A TRPM2 izolált NUDT9-H doménja is aktív ADPRáz, és szerkezete jól modellezhető a NUDT9 kristályszerkezete alapján.

A TRPM2 csatornákat a NUDT9-H doménhoz kötődő ADPR aktiválja. Az ADPR a kapocs az oxidatív stressz és a TRPM2 aktiváció között: élő sejtben ROS hatására ADPR szabadul fel a mitochondriumból. A citoszolikus ADPR nagy affinitással aktiválja a TRPM2-t, de az aktiváció mechanizmusa és az ADPRáz aktivitás szerepe ismeretlen. Intakt sejtekben az intra-és extracelluláris Ca^{2+} is fokozza az ADPR-aktiválta TRPM2 áramot, és még számos egyéb modulátor is befolyásolja azt (pl. H_2O_2 , AMP, ciklikus ADPR (cADPR), nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP)). Kutatásaink kezdetén nem volt ismert, hogy e modulátorok közvetlenül a TRPM2 csatornához kötődve, vagy az ADPR és a Ca^{2+} koncentrációinak befolyásolása révén hatnak.

A TRPM2 különböző kórképekben játszott szerepe révén új, ígéretes terápiás célpont, amelynek mind gátlása (pl., stroke, szívinfarktus, Alzheimer-kór, krónikus gyulladás, hiperinzulinizmus), mind serkentése (pl., diabetes, Parkinson demencia, amiotrófiás laterálszklerózis, bipoláris zavar) hasznos lehet. A TRP család tagjainak sokrétű szerepe miatt azonban egy klinikailag hasznosítható TRPM2 modulátornak mindenekelőtt rendkívül szelektívnek kell lennie. Mivel a NUDT9-H domén a TRPM2 egyetlen egyedi fehérje szegmense, ez a domén a legkézenfekvőbb célpont. Ugyanakkor erről a "chanzyme" doménról egyelőre korlátozottak az ismereteink.

2.3. Egyedi csatornás áram regisztrátumok elemzése

Egyedi csatornák nyitott illetve zárt állapotban eltöltött tartózkodási időinek eloszlásai információt hordoznak a kapuzás molekuláris mechanizmusáról. Ezen eloszlásokhoz maximum likelihood módszerrel kinetikai modellek illeszthetők, s e modellek paraméterei becsülhetők. Munkánk kezdetekor azonban nem állt rendelkezésre hatékony módszer több aktív csatornát tartalmazó patch regisztrátumok ilyen célú elemzésére. Szintén kidolgozatlan volt alternatív kinetikai modellek statisztikailag korrekt rangsorolása.

3. CÉLKITŰZÉSEK

3.1. A CFTR szerkezete, működése

3.1.1. A CFTR moduláris felépítése, domén határok

Az ABC fehérjék felépítése moduláris, az egyes domének sokszor külön génekről, önálló polipeptid láncként termelődnek, és a translációt követően épülnek össze funkcionális transzporterré. Bár a CFTR egyetlen polipeptidláncból áll, szerkezete szintén moduláris (TMD1 – NBD1 – R-domén – TMD2 – NBD2). Tisztázni kívántuk, hogy előállíthatók-e funkcionális CFTR csatornák külön-külön megtermelt domének összeépülésével. E módszer segítségével ellenőrizni kívántuk a szekvencia alapján jóslott doménhatárok pontosságát.

3.1.2. A CFTR foszforilációs szabályozása

Tisztázni kívántuk, hogy a foszforilált R-domén aktiváló hatású-e, vagy a nem-foszforilált R-domén okoz gátlást. Bár az R-domén foszforilációja összességében aktiváló hatású, a 768-as szerinről leírták, hogy foszforilációja erősen csökkenti a csatorna aktivitását. Ezért részletesen meg kívántuk vizsgálni az S768 oldallánc foszforilációjának kinetikáját és funkcionális következményeit. A CFTR NBD1 szekvenciája tartalmaz két "nem kanonikus" szekvenciaszakaszt, amelyek más ABC fehérjék NBD doménjeiben nem találhatók meg. Felvetődött, hogy ezek fontos szerepet játszhatnak a foszforilációs szabályozásban, ezért meg kívántuk vizsgálni e szakaszok deléciójának funkcionális következményeit is.

3.1.3. A CFTR ATP-függő kapuzási ciklusának mechanizmusa

Termodinamikai szempontból kívántuk jellemezni a kapuzási ciklust, hogy feltérképezhessük az egyes konformációváltozások energetikáját. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a CFTR kapuzása valóban nem-egyensúlyi, ciklikus folyamat-e, és hogy mennyire szoros a csatolás az ATPáz ciklus illetve a kapuzási ciklus között.

3.1.4. CFTR stimulátorok molekuláris hatásmechanizmusa

Az 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoát (NPPB) pórusblokkoló tulajdonságú molekula, amely azonban emellett erőteljesen stimulálja a CFTR kapuzását: jelenleg ez a vegyület a ΔF508 -as mutáns legnagyobb hatásereőségű ismert aktivátora, amely 15-20-szorosára növeli a mutáns csatorna nyitvatartási

valószínűségét. A CFTR stimulátorok lehetséges terápiás jelentősége miatt tisztázni kívántuk az NPPB kapuzási hatásának mechanizmusát, illetve e droghatás szerkezeti feltételeit.

3.2. A TRPM2 szerkezete, működése

3.2.1. A TRPM2 biofizikai vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer létrehozása

Olyan heterológ rendszert kívántunk beállítani, amelyben a humán TRPM2 csatorna izolált membránban vizsgálható a citoszolikus felszín direkt perfúziója mellett.

3.2.2. A TRPM2 Ca^{2+} függő szabályozása

Tisztázni kívántuk a csatornát aktiváló Ca^{2+} kötőhelyeinek térbeli elhelyezkedését, a Ca^{2+} aktiváció molekuláris mechanizmusát.

3.2.3. A TRPM2 ADPR-függő szabályozása

Tisztázni kívántuk, hogy a NUDT9-H domén az intakt csatornában is hasítja-e az ADPR-t, illetve, hogy mennyire szoros katalízis és kapuzás kapcsoltsága.

3.2.4. A TRPM2 egyéb modulátorai

Tisztázni kívántuk, hogy a H_2O_2 , AMP, cADPR, illetve NAADP közvetlenül a TRPM2-höz kötődve fejtik-e ki hatásaikat.

3.2.5. A TRPM2 inaktivációjának mechanizmusa

Tisztázni kívántuk az inside-out patch-ben, ADPR és Ca^{2+} fenntartott jelenlétében tapasztalható gyors inaktiváció mechanizmusát, és módot kívántunk találni annak kiküszöbölésére.

3.2.6. A TRPM2 PIP_2 -függő szabályozása

Meg kívántuk vizsgálni, hogy a foszfatidil inozitol biszfoszfát (PIP_2) hatással van-e a TRPM2 működésére.

3.3. Elméleti célkitűzések

3.3.1. Többcsatornás regisztrátumok kinetikai elemzése

Létre kívántunk hozni egy módszert kinetikai modellek maximum likelihood illesztésére olyan patch regisztrátumok esetén, amelyekben több mint egy csatorna aktivitása látszik.

3.3.2. Alternatív kinetikai modellek statisztikai rangsorolása

Vizsgálni kívántuk, hogy a maximum likelihood illesztés paramétereiből létrehozható-e megbízható statisztikai teszt alternatív kinetikai modellek rangsorolására.

3.3.3. Nem-egyensúlyi rendszerek termodinamikai vizsgálata

Vizsgálni kívántuk, hogy a REFER (rate-equilibrium free energy relationship) analízis módszerével milyen termodinamikai információ nyerhető egy nem-egyensúlyi rendszerről.

4. A KÍSÉRLETEK ÉS AZ ADATELEMZÉS MÓDSZEREI

4.1. Molekuláris biológia

A humán CFTR és TRPM2 cDNS-eket a pGEMHE vektorba klónoztuk. Pontmutációkat a Stratagene Quikchange Kit-tel hoztunk létre, moduláris konstrukciókhoz az egyes szegmenseket PCR-rel amplifikáltuk. RNS-t T7 polimeráz felhasználásával *in vitro* transzkripcióval állítottunk elő. Minden konstrukciót teljes szekvenálással ellenőriztünk.

4.6. Nukleotidok tisztítása, tisztaságának ellenőrzése

Nukleotidok (ADPR, cADPR, NAADP, NAAD, NAD, ATP, ADP, AMP) tisztaságát vékonyréteg kromatográfiával ellenőriztük. A cADPR (Sigma) törzsoldat ADPR szennyeződését enzimatisztítással távolítottuk el.

4.7. Anionok Ca^{2+} affinitásának fluoreszcens meghatározása

A glukonát és glutamát anionok Ca^{2+} iránti affinitását kalibrált Ca-green 5N fluoreszcencia segítségével, titrálós kísérletekben határoztuk meg.

4.2. *Xenopus laevis* petesejtek izolálása, injektálása

A békapetesejteket hasi metszésből eltávolított petefészek-lebenyekből kollagenázos emésztéssel izoláltuk. A tisztított cRNS-t mikroinjektálással juttattuk a sejtekbe.

4.3. Inside-out patch mérések

Az ioncsatorna áramokat a petesejtekből kiszakított inside-out patch preparátumokból vezettük el. A patch citoszolikus felszínét folyamatosan perfundáltuk, a citoszolikus oldat összetételét számítógép-vezérelt elektronikus szelepek segítségével ~30 ms időállandóval tudtuk cserélni.

4.4. Steady state egyedi csatornás mérések kinetikai elemzése

Az ioncsatorna áramokat félamplitúdó módszerrel idealizáltuk, az eseménylistákhoz kinetikai modelleket maximum likelihood módszerrel illesztettünk. Az adatelemzésekhez kizárólag saját fejlesztésű szoftvereket használtunk.

4.5. Egyedi csatornák vezetőképességének meghatározása

Az egyedi csatornaáramok nagyságát amplitúdó

hisztogramokhoz illesztett Gauss görbék csúcsainak távolságaként definiáltuk.

4.5. Makroszkópos áramrelaxációk illesztése

Aktiváló ligandok koncentrációinak hirtelen megváltoztatását követő áramrelaxációk kinetikáját illesztett exponenciálisok időállandóival jellemeztük.

5. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. A CFTR szerkezete, működése

5.1.1. A CFTR moduláris felépítése, domén határok

Megállapítottuk, hogy működőképes CFTR csatornák állíthatók elő egymással komplementer rész-szegmensek együttes expressziójával. Például, a TMD1 szegmens (1-432-es aminosavak) és az NBD1/R-domén/TMD2/NBD2 szegmens (433-1480) együttes expressziója a vad típusúhoz (WT) mindenben hasonló csatornákat eredményez. Hasonlóképpen, működőképes csatornákat eredményez a TMD1/NBD1 (1-633) és az R-domén/TMD2/NBD2 (634-1480) szegmensek, illetve a TMD1/NBD1/R-domén (1-835) és a TMD2/NBD2 (837-1480) szegmensek együttes expressziója. Ezzel szemben, a fenti rész-szegmensek egyike sem képez önmagában működő csatornát. Szintén nem keletkeznek működő csatornák, ha a vágási hely az NBD1 domén belsejében, azaz a 433-as és a 633-as pozíció között található. E módszer alapján az NBD1 domén N-terminális határát a 433-as aminosav környékére, C-terminális határát pedig a 633-as aminosav környékére jósoltuk.

5.1.2. A CFTR foszforilációs szabályozása

A WT CFTR csak PKA-val történő foszforilációt követően aktív. A TMD1/NBD1 (1-633) szegmens és a TMD2/NBD2 (837-1480) szegmens együttes expressziójával olyan csatornát állítottunk elő, amelyből hiányzik az R domén (cut-ΔR). Ezek a csatornák működőképesek, és ATP-függő kapuzásuk a WT csatornáéhoz hasonló. A cut-ΔR csatornák aktivitásához azonban nem szükséges foszforiláció, ebből arra következtettünk, hogy az R-domén döntően gátló hatású: a WT csatornák nem-foszforilált R-doménja gátolja a csatornák kapuzását, s e gátlás felfüggeszthető az R-domén foszforilációjával, vagy deléciójával is.

Az NBD1 domén röntgenkristallográfiás szerkezete tovább pontosította e domén határait. Kiderült, hogy az NBD1 domént valójában a ~390-638 aminosavak alkotják, azonban a 404-435-ös szakasz egyedi beékelődés (regulatory insertion, RI), amely egyetlen másik ABC fehérjében sem található meg. Mind az RI, mind az NBD1-et követő 639-670-es szakasz (regulatory extension, RE) tartalmaz PKA-szubsztrát szerint (S422, illetve S660), és

szerkezete foszforiláció-függőnek bizonyult. Ezért felmerült, hogy e két szakasz fontos szerepet játszhat a CFTR foszforiláció-függő szabályozásában. Ko-expressziós kísérleteinkhez készült konstrukcióink lehetőséget biztosítottak e két szakasz szelektív deléciójára. Az 1-414-es és 433-1480-as szegmensek ko-expressziója az RI, az 1-633-as és 668-1480-as szegmenseké pedig az RE jelentős részét iktatta ki. Sem az RI, sem az RE kiiktatása nem függesztette fel a CFTR aktiváció szigorú foszforiláció-függését, és nem befolyásolta lényegesen a csatornák kapuzását. Nem volt számottevő hatása annak sem, ha az RI deléciójával egyidőben az RE egyetlen foszforilálható szerinjét is kiküszöböltük (1-633(S422A) és 668-1480 szegmensek ko-expressziója). Tehát sem az RI, sem az RE szakasz jelenléte nem szükséges a CFTR foszforiláció-függő szabályozásához.

A 768-as R-domén szerin szerepének megértése céljából megvizsgáltuk az S768A mutánst. A WT csatornákkal ellentétben az S768A csatornák a petesejtekben már nyugalmi állapotban, a cAMP útvonal stimulálása nélkül is, közel maximálisan aktívak, ez az aktivitás azonban PKA gátlószerek (Rp-cAMPS) injektálására elenyészik. Inside-out patch-ben a WT csatornákhöz hasonlóan az S768A csatornák is csak PKA-val aktiválhatók, azonban ehhez alacsonyabb koncentrációjú PKA is elegendő: e fokozott PKA érzékenység eredménye a nyugalmi sejtekben mért nagy S768A áram. Tömegspektrometriás mérésekkel igazoltuk, hogy nyugalmi sejtekben a WT csatornák 768-as szerinje valóban foszforilálva van, amint ezt az S768A mutáns markáns fenotípusa alapján feltételeztük. PKA és γ -³²P-ATP jelenlétében foszforilált izolált R-domén peptid tömegspektrometriás elemzése igazolta, hogy WT csatornáknál a 768-as szerin foszforilálódik leggyorsabban. Ezzel szemben a többi R-domén szerin foszforilációjának kinetikája nem változott az S768A mutáció hatására. Eredményeink alapján a WT csatornáknál a 768-as szerin már nyugalmi PKA aktivitás mellett is foszforilálódik, ez a modifikáció pedig jobbra tolja el a csatornák aktivitásának foszforiláció-függését. A jelenség élettani jelentősége nem ismert, feltételezésünk szerint biztosítja a CFTR aktivitásának finomabb szabályozhatóságát.

5.1.3. Az ATP-függő kapuzási ciklus mechanizmusa

A CFTR kapuzási lépéseinek termodinamikai jellemzése céljából megvizsgáltuk a WT csatornák nyitási és záródási sebességeinek hőmérsékletfüggését (15-35°C között). Miután a WT CFTR záródása ATP hidrolízishez kötött, megvizsgáltuk katalitikusan inaktív mutánsok (pl. K1250A) záródási sebességének hőmérsékletfüggését is: e csatornák lassú záródása, amely az ATP-t kötött NBD dimer lassú szétesését tükrözi, valójában a nyitási lépés visszafordításának tekinthető. Az egyes kapuzási lépések aktivációs entalpiáit ($\Delta H^\ddagger$) Eyring diagramok meredekségeiből határoztuk meg, míg maguk a sebességek felső becslést adtak az aktivációs szabadentalpiákra ($\Delta G_{\max}^\ddagger$); e két paraméterből egyszersmind az aktivációs entrópia alsó becslése ($\Delta S_{\min}^\ddagger$) is adódott. A nyitás és nem-hidrolitikus záródás $\Delta H^\ddagger$ értékei ~120, illetve ~40 kJ/mol értéknek adódtak, azaz a nyitási aktivált állapotban a fehérjét nagyfokú feszülés jellemzi, amely a nyitott állapotban csak részben oldódik. Az aktivációs entalpiánál jóval kisebb nyitási $\Delta G_{\max}^\ddagger$ (~80 kJ/mol) alapján a nyitási aktivált állapot elérése jelentős entrópiánövekedéssel párosul ($T\Delta S_{\min}^\ddagger$ ~40 kJ/mol). Ez konzisztens azzal a korábbi felvetéssel, miszerint a nyitási aktivált állapotban az NBD dimer már kialakult: az entrópiánövekedés a két NBD összezáruló felszíneiről lezorzuló rendezett hidrátburok szétesését tükrözheti. Eredményeink egy tovaterjedő konformációs hullámmal magyarázhatók. Eszerint a nyitási konformációváltozást az NBD dimer kialakulása indítja el, e folyamatban a két ATP molekuláris ragasztó szerepét tölti be. Az NBD dimer kialakulása feszülést idéz elő a még zárt állapotú TMD-ban, amely annak megnyílásakor – további entrópiánövekedés mellett – részlegesen oldódik. Ezzel szemben a WT csatornák záródásakor a $\Delta H^\ddagger$ (~70 kJ/mol) és $\Delta G_{\max}^\ddagger$ (~70 kJ/mol) értékek hasonlóak, nincs számottevő entrópiaváltozás. Ez konzisztens azzal az elképzeléssel, hogy a záródás sebességmeghatározó lépése az ATP hidrolízis: e lépés aktivációs állapota egyetlen kémiai kötés – az ATP β - γ kötése – feszülését tükrözi.

A CFTR által katalizált ATP hidrolízis fiziológiás körülmények között irreverzibilis, nem egyensúlyi folyamat. Sokáig vitatott volt azonban, hogy a pórus kapuzásának mechanizmusa mennyire szorosan csatolt ehhez az ATPáz aktivitáshoz. Miután az

ioncsatornák döntő többségének kapuzása egyensúlyi folyamat, sokan kétségbevonták, hogy a CFTR esetében ez másképpen lehetne. Az egyedi csatornák nyitott illetve csukott állapotban eltöltött tartózkodási időinek eloszlásai egyértelmű lehetőséget biztosítanak a kapuzás nem-egyensúlyi voltának vizsgálatára. Matematikai úton megmutatható, hogy egyensúlyi folyamatok esetén ezek az eloszlások monoton csökkenők – csúcsos eloszlások kizárólag nem-egyensúlyi mechanizmus esetén jöhetnek létre. Ezért egyedi csatornás mérésekből rekonstruáltuk WT és mutáns CFTR csatornák nyitási idő eloszlásait. WT csatornák esetén csúcsos eloszlást találtunk, míg a 2-es kötőhely konzervált Walker B aszpartátjának mutációja (D1370N) hatására az eloszlás monoton csökkenővé vált. Maximum likelihood illesztések segítségével megállapítottuk, hogy WT csatornák esetén – a CFTR transzporter eredetének megfelelően – szoros csatolás van az ATPáz ciklus és a kapuzási ciklus között: a nyitások >95%-a ATP hidrolízissel végződik. Egyes mutációk azonban lazíthatják e csatolás szorosságát. A K464A mutáció (NBD1 Walker A motívum) például csökkenti az ATP hidrolízis sebességét, ugyanakkor destabilizálja az NBD dimert, így a nyitásoknak csak ~20%-a végződik ATP hidrolízissel. Végző esetben, a katalízis teljes megszüntetése esetén (pl. D1370N), lassú, nem-hidrolitikus kapuzás tapasztalható (0% csatolás).

5.1.4. Egy CFTR stimulátor szerkezet-aktivitás vizsgálata

Az 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoát (NPPB) feszültségfüggő pórusblokkoló, amely emellett erőteljesen növeli a CFTR nyitvatartási valószínűségét. A CFTR stimulátorok lehetséges terápiás jelentősége miatt feltártuk az NPPB kapuzási hatásának mechanizmusát. Az alkalmazott maximális NPPB koncentráció (210 μ M) mellett a WT CFTR csatornák nyitvatartási valószínűsége kb. 4-szeresére, a Δ F508 CFTR csatornáké viszont kb. 20-szorosára nőtt. Ezzel szemben a kontrollként alkalmazott másik CFTR pórusblokkoló, a 3-(N-morfolino)propánszulfonát (MOPS) nem hatott a kapuzásra. A pórusblokkal ellentétben az NPPB kapuzási hatásai feszültségfüggetleneknek mutatkoztak, és nagy koncentrációjú MOPS jelenléte sem függesztette fel azokat. Ez arra utal, hogy az NPPB "kapuzási kötőhelye" a póruson kívül található.

Az NPPB okozta stimuláció molekuláris mechanizmusának megértése érdekében részletesen tanulmányoztuk az egyes

kapuzási lépések sebességére gyakorolt hatásait. Megállapítottuk, hogy a drog az ATP hidrolízis gátlása révén kb. 4-szeresére nyújtja a vad típusú csatornák átlagos nyitvatartási idejét. Emellett kb. 3-szorosára növeli mind a vad-típusú csatornák nyitási sebességét, mind a katalitikusan inaktív (K1250A, E1371S) mutánsok nem-hidrolitikus záródási sebességét: azaz a nyitási lépésre katalizátorként hat. Értelmezésünk szerint (ld. 5.1.3. alfejezet) e nyitási átmeneti állapotban fellépő feszülés a már kialakult NBD dimer és a még zárt konformációjú TMD domén érintkezési felszínén jelentkezik. Kézenfekvő tehát, hogy az NPPB kapuzási kötőhelye, amely azonosítása esetén új célpontot jelenthetne a CFTR-t aktiváló gyógyszerek tervezésében, valahol ebben a régióban található.

A szerkezet-hatás összefüggések jobb megértése érdekében megvizsgáltuk, hogy az NPPB két, kinetikailag elkülöníthető kapuzási hatásáért a komplex molekula különböző részei felelősek-e. E célból "kettévágtuk" az NPPB molekulát egy 3-nitrobenzoát (3NB, "feji vég") és egy 3-fenilpropilamin (3PP, "farki vég") részre, és külön-külön vizsgáltuk a két részmolekula kapuzásra, illetve permeációra gyakorolt hatásait. Várakozásunknak megfelelően az NPPB pórusblokkoló tulajdonsága a 3NB karboxil csoportjának volt tulajdonítható, míg a 3PP kevésbé befolyásolta a csatornapórus vezetőképségét. Meglepetésre azonban mind a 3NB, mind a 3PP erőteljesen stimulálta a CFTR nyitvatartási valószínűségét. Részletes kinetikai analízis alapján a 3NB kb. harmadára csökkenti mind a WT CFTR csatornák átlagos csukvatartási idejét, mind a nem-hidrolitikus K1250A mutáns nyitvatartási idejét, viszont nem hat a WT csatornák nyitvatartási idejére. Ezzel szemben a 3PP szelektíven ez utóbbi paramétert nyújtja meg. A 3NB és a 3PP részmolekulák aktiváló hatásai tehát mikroszkópikus szinten eltérően valósulnak meg: a 3NB kizárólag a nyitási konformációváltás átmeneti állapotát stabilizálja, míg a 3PP szelektíven az ATP hidrolízist gátolja. Ha a nyitvatartási valószínűség önmagában alacsony (pl. $\Delta F508$ mutáns), akkor az NPPB-nek ezen két kapuzási hatása egymástól függetlenül növeli azt. Ezért az NPPB szerkezet alapján tervezett hatásos potenciátor molekuláknak mindkét kapuzási hatást meg kellene őrizniük a pórusblokk kiiktatása mellett.

5.2. A TRPM2 szerkezete, működése

5.2.1. A TRPM2 biofizikai vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer létrehozása

A TRPM2 békapetesejtekben, inside-out patch-ben, történő vizsgálatához ki kellett iktatnunk e sejtek endogén Ca^{2+} aktivált Cl^- áramát. Megmutattuk, hogy szimmetrikus 140 mM-os Na-glukonát oldatban az intracelluláris Ca^{2+} nem indukál endogén áramot, így a TRPM2 áram szelektíven vizsgálható. Mivel a TRPM2-t intracelluláris Ca^{2+} aktiválja, fluoreszcens titrálós módszerrel meghatároztuk a glukonát Ca^{2+} affinitását, így kiszámíthattuk glukonát alapú kád-oldataink szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -ját. Inside-out patch-clamp kísérleti rendszerünk lehetővé tette az intracelluláris ligand koncentrációk direkt, gyors kontrollját, különböző membránpotenciálokon hirtelen koncentrációváltásokra kapott makroszkópos válaszok kinetikájának, illetve egyedi csatornák steady-state kapuzásának vizsgálatát.

5.2.2. A TRPM2 Ca^{2+} függő szabályozása

Megállapítottuk, hogy telítési intracelluláris $[\text{ADPR}]$ és alacsony (4 μM) extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében a TRPM2 csatornáknak mind a nyitási, mind a csukódási sebessége az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ függvénye; a $[\text{Ca}^{2+}]$ emelése gyorsítja a nyitást ($K_{1/2}=158 \mu\text{M}$) és lassítja a csukódást ($K_{1/2}=379 \text{ nM}$). E két hatás nagyon eltérő $K_{1/2}$ értéke arra utal, hogy a nyitott csatornák jóval erősebben kötik a Ca^{2+} -ot mint a csukott csatornák – éppen ez a Ca^{2+} aktiváló hatásának magyarázata. A mikroszkópikus kinetika a Monod-Wyman-Changeux modellel írható le: a TRPM2-t négy Ca^{2+} ion kötődése aktiválja; minden újabb kötődés kb. 33-szorosára növeli a nyitott/csukott egyensúlyi állandót, összesen kb. 10^6 -szoros aktivációt okozva.

Kimutattuk, hogy magas (1 mM) extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenléte nincs hatással a csatornák nyitási sebességére, tehát a csukott csatornák nem érzékelik az extracelluláris Ca^{2+} -ot. Amint azonban egy csatorna megnyílik, a pórusán beáramló Ca^{2+} késlelteti a csatorna becsukódását, mert telítésben tartja az aktiváló kötőhelyeket – dacára az intracelluláris felszín Ca^{2+} -mentes oldattal történő folyamatos, gyors mosásának. Az aktiváló kötőhelyek tehát a csatorna kapujától intracelluláris irányban helyezkednek el, de nem a csatorna fehérje felszínén, hanem egy mély üregben

(vesztibulumban), a pórus bemenetének közvetlen közelében. Ezt a következtetést megerősíti, hogy pozitívabb membránpotenciálók alkalmazásakor az extracelluláris Ca^{2+} kapuzásra gyakorolt hatása a Ca^{2+} beáramlás hajtóerejének csökkenésével arányosan mérséklődik. A Ca^{2+} kötőhelyek mind csukott, mind nyitott állapotban szabadon hozzáférhetők az oldat számára.

5.2.3. A TRPM2 ADPR-függő szabályozása

A TRPM2 csatornát aktiváló ADPR-t a csatorna intracelluláris karboxi-terminális NUDT9-H doménje köti, amely ~40% szekvencia homológiát mutat a NUDT9 nevű mitochondriális ADPRáz enzimmel. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az izolált NUDT9-H domén is aktív ADPRáz, ezért kézenfekvő és stratégiaileg fontos kérdés volt, hogy a TRPM2 kapuzása is – a CFTR-éhez hasonlóan – enzimatisz aktivitáshoz kapcsolt nem-egyensúlyi folyamat-e. Felvetődött például, hogy a lassú ADPR hidrolízis a G_{α} -fehérjék GTPáz aktivitásához hasonló időzítő mechanizmus lehetne, amely korlátozza az aktív periódus időtartamát. E feltevés értelmében a csatornák ADPR hirtelen megvonását követően mérhető lassú csukódási sebessége (~0.5 s⁻¹) az ADPR hasítás sebességét tükrözné. E kérdés tisztázása érdekében ellenőrizni kívántuk, hogy a csatorna leírt enzimatisz aktivitása hogyan kapcsolódik a csatorna kapuzásához.

Először megvizsgáltuk a NUDT9-H domén pontmutációinak hatását a TRPM2 csatorna kapuzására. Az ADPRázok konzervált "Nudix-box" motívuma (konszenzus **REFXEE**) a TRPM2 NUDT9-H doménjében atípusos (**RILRQE**). A NUDT9 enzimben az EF→IL mutáció (ld. TRPM2) 1%-ára csökkenti, az EE→KK mutáció felfüggeszti az ADPRáz aktivitást. Ennek analógiájára létrehoztunk egy feltételezhetően "inaktív" QE→KK (Q1408K/E1409K) és egy feltételezhetően "hiperaktív" IL→EF (I1405E/E1406F) TRPM2 mutánst. Azonban e négy egyedi és két dupla mutáció egyike sem befolyásolta az ADPR iránti látszólagos affinitást ($K_{1/2}$ ~1 μM) és az ADPR elvonását követő csukódási sebességet. Ugyancsak nem volt hatása a kapuzásra a feltételezett katalitikus bázisként működő aszpartát oldallánc csonkításának (D1468A) sem.

A fenti mutációk kapuzásra kifejtett hatásának hiányát egyaránt magyarázhatja, (a) ha a NUDT9-H domén eleve katalitikusan inaktív, (b) ha az ADPR hasításának nincs hatása a

kapuzásra, vagy (c) ha a vizsgált Nudix-box oldalláncok nem szükségesek a katalízishez (a homológ NUDT9 enzim kristályszerkezete felvetette, hogy a katalízis kémiai mechanizmusa nem teljesen konzervált az ADPRázok között). A kérdés alternatív megközelítéseként megszintetizáltunk egy nem-hidrolizálható ADPR analógot, amelyben az α és β foszfátokat metilén-híd köti össze (AMPCPR). Miután vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatokkal ellenőriztük, hogy az AMPCPR-t még a NUDT9-H doménál kb. 100-szor aktívabb NUDT9 enzim sem képes elhasítani, megvizsgáltuk ezen analóg hatását a TRPM2 csatornákra. Az ADPR-hoz hasonlóan, az AMPCPR is alkalmasnak bizonyult a csatornák megnyitására, bizonyítva ezzel, hogy a ligand elhasítása nem feltétele a pórus megnyílásának. Ugyanakkor, az AMPCPR az ADPR-éhez képest kb. 40-szer alacsonyabb látszólagos affinitással aktivált. Ennek hátterében a nyitási sebesség stimulációjának kisebb hatékonysága állt, ami a csukott csatornákhöz való kötődés csökkent affinitását tükrözi. Ráadásul, az AMPCPR részleges agonistának bizonyult, azaz telítési koncentrációban is csak kb. fele akkora nyitvatartási valószínűséget biztosított mint az ADPR. E csökkent hatáserősséget az AMPCPR-t kötött csatornák rövidebb nyitvatartási ideje, azaz a nyitott állapot csökkent stabilitása okozta: ennek megfelelően az AMPCPR elvonását követő záródási sebesség is az ADPR elvonását követőéhez képest kb. 3-szor gyorsabbnak mutatkozott. Ez azt bizonyítja, hogy a ligand elhasítása a pórus bezáródásának sem feltétele. Összességében megállapítottuk, hogy a TRPM2 csatornák ADPR-stimulálta kapuzása és a ligand esetleges hidrolízise között nem áll fenn csatolás, azaz a TRPM2 esetében a pórus kapuzása egyensúlyi folyamat.

5.2.4. A TRPM2 egyéb modulátorai

Megállapítottuk, hogy – intakt sejtekkel ellentétben – izolált patch membránban a H₂O₂ nem aktiválja a TRPM2-t és nem befolyásolja az ADPR-kiváltotta aktivitást. Úgyszintén, izolált patch-ben nem hat a TRPM2 aktivitásra sem az AMP, sem az enzimatisz tiszttított cADPR (a kereskedelmi forgalomban kapható cADPR-t ADPR-zal erősen szennyezettnek találtuk). Az NAADP kisaffinitású (K_m =100 μM) parciális agonistának bizonyult (50% hatékonyság) és nem szinergizált az ADPR-zal, az NAAD-t pedig teljesértékű, de

kisaffinitású ($K_m=30\ \mu\text{M}$) agonistának találtuk. Tehát a H_2O_2 , AMP, cADPR, NAADP, és NAAD nem közvetlenül a TRPM2 fehérjéhez kötődnek: celluláris hatásaik részben közvetettek, részben pedig szennyeződést tükröznek.

5.2.5. A TRPM2 inaktivációjának mechanizmusa

Megállapítottuk, hogy a WT TRPM2 gyors inaktivációja állapotfüggő, valamint függ a permeáló ionok fajtájától és koncentrációjától – ez valószínűsítette a szelektáló filter szerepét e folyamatban. A rokon TRPM5 csatorna filter szekvenciáját utánzó tripla mutáns TRPM2 (T5L TRPM2) nem inaktiválódik Ca^{2+} és ADPR fenntartott jelenlétében. A WT TRPM2 inaktivációját tehát a szelektáló filter konformációváltozása okozza. Mivel a T5L mutáció nem változtatta meg a kapuzás Ca^{2+} - és ADPR-függését, e pórusmutáns kiváló modell a kapuzás steady-state körülmények közötti vizsgálatához.

5.2.6. A TRPM2 PIP_2 -függő szabályozása

Megállapítottuk, hogy a membrán PIP_2 tartalmának teljes deplécója a TRPM2 csatornák záródásához vezet, ilyen körülmények között a csatornák csak mM-os intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében nyithatók meg. A PIP_2 tehát a TRPM2 látszólagos Ca^{2+} érzékenységet befolyásolja. Ugyanakkor a nyitott TRPM2 csatornák nagy affinitással kötik a PIP_2 -t, mert a T5L mutáns aktivitása Ca^{2+} és ADPR jelenlétében még a patch kiszakítását követő 1 óra alatt sem csökken lényegesen, míg a membrán szabad PIP_2 tartalma a kiszakítást követően percek alatt elenyészik.

5.3. Elméleti eredmények

3.3.1. Többcsatornás regisztrátumok kinetikai elemzése

Létrehoztam egy maximum-likelihood alapú matematikai eljárást, amelynek segítségével az egyedi csatornák kapuzási paraméterei meghatározhatók több mint egy aktív csatornát tartalmazó patch regisztrátumokból is. A módszert szoftver csomag formájában meg is valósítottam; e szoftvert azóta több kutatócsoport használja világszerte, segítségével eddig >30 rangos közlemény született.

3.3.2. Alternatív kinetikai modellek statisztikai rangsorolása

Kidolgoztam egy statisztikai módszert, amelynek segítségével a lehetséges kapuzási modellek a maximum-likelihood illesztés alapján statisztikailag rangsorolhatók.

3.3.3. Nem-egyensúlyi rendszerek termodinamikai vizsgálata

Matematikai úton kimutattam, hogy egyedi-csatornás mérések REFER analízise segítségével semmilyen termodinamikai információ nem nyerhető abban az esetben, ha a kapuzás nincs egyensúlyban. Ezért nem állják meg a helyüket a szakirodalomban a CFTR csatornáról leírt olyan következtetések, amelyek ezen módszerrel kapott eredményekre épülnek.

6. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

6.1. A CFTR szerkezete és működése

A CFTR – moduláris szerkezetének megfelelően – több polipeptid szegmensből is összeépíthető. Az R-domén nem foszforilált formájában gátló hatású. A 768-as R-domén szerin foszforilációja csökkenti a CFTR PKA iránti érzékenységet. A nem konzervált RI és RE szakaszok nem szükségesek a csatorna foszforiláció-függő szabályozásához. A csatornanyitás hullámszerűen terjedő konformációváltozás, amelyet az NBD-k ATP kötését követő dimerizációja indít. A nyitási aktivált állapotot nagyfokú feszülés jellemzi, ebben az állapotban a dimer már kialakult, de a pórus valószínűleg még zárt. A WT CFTR csatorna kapuzása ciklikus, nem-egyensúlyi folyamat, amely szorosan csatolt az ATP hidrolíziséhez: a nyitási események >95%-a ATP hidrolízissel végződik. Az ATP hidrolízis a záródás sebességmeghatározó lépése. Az NPPB a $\Delta F508$ CFTR csatorna egyik legnagyobb hatásereőségű stimulátora. A stimuláció két kinetikailag elkülöníthető hatás – a nyitási lépés energiagátjának csökkentése és az ATP-hasítási lépés gátlása – révén valósul meg. A fenti két hatásért szelektíven a drog molekula két komplementer része felelős: a 3-nitrobenzoát rész csak a nyitási lépésre, míg a 3-fenilpropilamin rész csak az ATP-hasítási lépésre hat.

6.2. A TRPM2 szerkezete és működése

Az intracelluláris ADPR, az intracelluláris Ca^{2+} , és a membrán belső rétegében található PIP_2 a TRPM2 csatorna ko-aktivátorai. A négy alegységhez kötődő Ca^{2+} ionok a Monod-Wyman-Changeux mechanizmussal aktiválják a csatornát, összeségében $>10^6$ -szorosára növelik a nyitott/csukott egyensúlyi állandót. Az aktiváló Ca^{2+} kötőhelyek a kaputól intracellulárisan, de a pórus közvetlen közelében találhatók, és mind csukott, mind nyitott állapotban gyors egyensúlyban vannak az oldattal. Fiziológiás körülmények között a nyitott póruson beáramló Ca^{2+} ionok telítésben tartják az aktiváló kötőhelyeket. Az ADPR elsősorban a zárt konformációjú csatornához képes kötődni, azonban a csatorna nyitott állapotában sem okkludálódik teljesen. A csatorna kapuzása egyensúlyi folyamat, amely nem csatolódik az ADPR hasításához. A H_2O_2 , cADPR, AMP, és NAADP közvetlenül nem befolyásolják a TRPM2 aktivitását, intakt sejtekben tapasztalt moduláló hatásaik

közvetettek. A csatornák nagy affinitással kötik a PIP_2 -t, a membrán PIP_2 tartalmának teljes depléciója esetén viszont csak mM-os $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett aktiválhatók. A WT TRPM2 kiszakított patch-ben tapasztalt gyors inaktivációját a szelektáló filter konformáció-változása okozza, amely a T5L mutációval megakadályozható.

6.3. Elméleti eredmények

Kapuzási kinetikai paraméterek több csatornát tartalmazó patch regisztrátumokból is kinyerhetők. Alternatív kinetikai modellek statisztikailag rangsorolhatók.

7. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Fordított kronológiai sorrend, aláhúzás=benyújtó szerző, *=PhD óta

7.1. A tézisek alapját képező idegen nyelvű közlemények

- *1. Tóth, B., Iordanov, I., **Csanády, L.** 2014. Putative chanzyme activity of TRPM2 cation channel is unrelated to pore gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111:16949-16954. IF: 9.809.
- *2. **Csanády, L.**, Töröcsik B. 2014. Structure-activity analysis of a CFTR channel potentiator: distinct molecular parts underlie dual gating effects. *J Gen Physiol*. 144:321-336. IF: 4.570.
- *3. **Csanády, L.**, Töröcsik B. 2014. Catalyst-like modulation of transition states for CFTR channel opening and closing: New stimulation strategy exploits nonequilibrium gating. *J Gen Physiol*. 143:269-287. IF: 4.570.
- *4. Tóth B., **Csanády, L.** 2012. Pore collapse underlies irreversible inactivation of TRPM2 channel currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109:13440-13445. IF: 9.681.
- *5. **Csanády, L.**, Vergani, P., Gadsby, D.C. 2010. Strict coupling between CFTR's catalytic cycle and gating of its Cl⁻ ion pore revealed by distributions of open channel burst durations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:1241-1246. IF: 9.771.
- *6. Tóth B., **Csanády, L.** 2010. Identification of direct and indirect effectors of the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel. *J. Biol. Chem*. 285:30091-102. IF: 5.328.
- *7. **Csanády, L.**, Töröcsik, B. 2009. Four Ca²⁺ ions activate TRPM2 channels by binding in deep crevices near the pore but intracellularly of the gate. *J. Gen. Physiol*. 133:189-203. IF: 4.260.
- *8. **Csanády, L.** 2009. Application of rate-equilibrium free energy relationship analysis to nonequilibrium ion channel gating mechanisms. *J. Gen. Physiol*. 134:129-136. IF: 4.260.
- *9. **Csanády, L.**, Mindell, J.A. 2008. The twain shall meet: channels, transporters and things between... Meeting on "Membrane

Transport in Flux: the ambiguous interface between channels and pumps" *EMBO Rep* 9:960-965. IF: 7.099.

- *10. Gadsby, D.C., Vergani, P., **Csanády, L.** 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440:477-483. IF: 26.681.
- *11. **Csanády, L.**, A.C. Nairn, Gadsby, D.C. 2006. Thermodynamics of CFTR channel gating: a spreading conformational change initiates an irreversible gating cycle. *J. Gen. Physiol*. 128:523-533. IF: 4.685.
- *12. **Csanády, L.** 2006. Statistical evaluation of ion-channel gating models based on distributions of LogLikelihood Ratios. *Biophys. J.* 90:3523-3545. IF: 4.757.
- *13. **Csanády, L.**, Seto-Young, D., Chan, K.W., Cenciarelli, C., Angel, B.B., Qin, J., McLachlin, D.T., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., Nairn, A.C., Gadsby, D.C. 2005. Preferential phosphorylation of R-domain serine 768 dampens activation of CFTR channels by PKA. *J. Gen. Physiol*. 125:171-186. IF: 4.410.
- *14. **Csanády, L.**, Chan, K.W., Nairn, A.C., Gadsby, D.C. 2005. Functional roles of nonconserved structural segments in CFTR's NH₂-terminal Nucleotide Binding Domain. *J. Gen. Physiol*. 125:43-55. IF: 4.410.
- 15. **Csanády, L.** 2000. Rapid kinetic analysis of multichannel records by a simultaneous fit to all dwell-time histograms. *Biophys. J.* 78:785-799. IF: 4.462.
- 16. **Csanády, L.**, Chan, K.W., Seto-Young, D., Kopsco, D.C., Nairn, A.C., Gadsby, D.C. 2000. Severed channels probe regulation of gating of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by its cytoplasmic domains. *J. Gen. Physiol*. 16:477-500. IF: 6.082.
- 17. Chan, K.W., **Csanády, L.**, Seto-Young, D., Nairn, A.C., Gadsby, D.C. 2000. Severed molecules functionally define the boundaries of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator's NH₂-terminal nucleotide binding domain. *J. Gen. Physiol*. 116:163-180. IF: 6.082.

7.2. Egyéb idegen nyelvű közlemények

- *18. **Csanády, L.**, Mihályi C, Szollosi A, Töröcsik B, Vergani P. 2013. Conformational changes in the catalytically inactive nucleotide-binding site of CFTR. *J Gen Physiol.* 142:61-73. IF: 4.570.
- *19. Szollosi, A., Muallem, D.R., **Csanády, L.**, Vergani, P. 2011. Mutant cycles at CFTR's non-canonical ATP-binding site support little interface separation during gating. *J. Gen. Physiol.* 137:549-62. IF: 3.841.
- *20. Homolya L., Orbán T.I., **Csanády, L.**, Sarkadi, B. 2011. Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808:154-163. IF: 3.990.
- *21. Szollosi A., Vergani P., **Csanády, L.** 2010. Involvement of F1296 and N1303 of CFTR in induced-fit conformational change in response to ATP binding at NBD2. *J. Gen. Physiol.* 136:407-23. IF: 4.283.
- *22. **Csanády, L.** 2010. Degenerate ABC composite site is stably glued together by trapped ATP. *J. Gen. Physiol.* 135:395-398. IF: 4.283.
- *23. **Csanády, L.** 2010. Permeating proton found guilty in compromising TRPM2 channel activity. *J. Physiol.* 588:1661-1662.
- *24. Chinopoulos, C., Vajda, Sz., **Csanády, L.**, Mándi, M., Mathe, K., Adam-Vizi, V. 2009. A Novel Kinetic Assay of Mitochondrial ATP-ADP Exchange Rate Mediated by the ANT. *Biophys. J.* 96:2490-2504. IF: 4.390.
- *25. Chan, K.W., Wheeler, A., **Csanády, L.** 2008. Sulfonylurea Receptors Type 1 and 2A Randomly Assemble to Form Heteromeric K_{ATP} Channels of Mixed Subunit Composition. *J. Gen. Physiol.* 131:43-58. IF: 4.711.
- *26. Fang, K., **Csanády, L.**, Chan, K.W. 2006. The N-terminal transmembrane domain (TMD0) and a cytosolic linker (L0) of sulfonylurea receptor define the unique intrinsic gating of K_{ATP}

channels. *J. Physiol.* 576:379-389. IF: 4.407.

- *27. **Csanády, L.**, Adam-Vizi, V. 2004. Antagonistic regulation of native Ca²⁺- and ATP-sensitive cation channels in brain capillaries by nucleotides and decavanadate. *J. Gen. Physiol.* 123:743-757. IF: 5.105.
- *28. **Csanády, L.**, Adam-Vizi, V. 2003. Ca²⁺- and voltage-dependent gating of Ca²⁺- and ATP-sensitive cationic channels in brain capillary endothelium. *Biophys. J.* 85:313-327. IF: 4.463.
- 29. **Csanády, L.**, Gadsby, D.C. 1999. CFTR channel gating: Incremental progress in irreversible steps. *J. Gen. Physiol.* 114:49-53. IF: 6.382

7.3. Magyar nyelvű közlemények: –**7.4. Könyvek, könyvfejezetek**

- *30. Vergani, P., Gadsby, D.C., **Csanády, L.** 2013. CFTR, an ion channel evolved from an ABC transporter. In: Roberts Gordon (Editor); Heidelberg: Springer-Verlag, *Encyclopedia of Biophysics* 254-265.
- *31. **Csanády, L.**, Vergani, P., Gulyás-Kovács, A., Gadsby, D.C. 2011. Electrophysiological, biochemical, and bioinformatic methods for studying CFTR channel gating and its regulation. *Methods Mol Biol.* 741:443-69.

7.5. Tudományos összesítés

Összes közlemények száma:	31
Összesített impakt faktor:	171.4
Hivatkozások (független):	820 (707)
H-index:	15

Egyedüli szerzős közlemények száma:	5
Elsőszerzős közlemények száma:	19
Utolsó szerzős közlemények száma:	12
Társ szerzős közlemények száma:	5
PhD óta megjelent közlemények száma:	27