

dc_745_13

MTA Doktori Értekezés

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



Dr. Csanády László

Semmelweis Egyetem

Orvosi Biokémiai Intézet

Budapest

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK.....	4
2. BEVEZETÉS.....	6
2.1. A biológiai membránokon keresztüli transzportfolyamatok biofizikája.....	7
2.1.1. A transzportfolyamatok klasszikus osztályozása.....	7
2.1.1.1. Klasszikus transzporterek (pumpák).....	7
2.1.1.2. Transzmembrán pórusok.....	8
2.1.2. A klasszikus osztályozás korlátai, a csatorna-transzporter határmezsgye..	10
2.1.3. Egyensúlyi és nem-egyensúlyi rendszerek elkülönítésének gyakorlati jelentősége.....	11
2.2. A CFTR klorid ioncsatorna.....	12
2.2.1. A CFTR élettani és kórélettani szerepe.....	12
2.2.2. A CFTR szerkezete, működése.....	14
2.2.3. A CFTR szerkezet-funkció kutatások gyakorlati jelentősége.....	20
2.3. A TRPM2 kation csatorna.....	21
2.3.1. A TRPM2 élettani és kórélettani szerepe.....	21
2.3.2. A TRPM2 szerkezete, működése.....	22
2.3.3. A TRPM2 szerkezet-funkció kutatások gyakorlati jelentősége.....	24
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	26
3.1. A CFTR szerkezete, működése.....	26
3.1.1. A CFTR moduláris felépítése, domén határok tisztázása.....	26
3.1.2. A CFTR foszforilációs szabályozása.....	26
3.1.3. A CFTR ATP-függő kapuzási ciklusának mechanizmusa.....	26
3.1.4. CFTR stimulátorok molekuláris hatásmechanizmusa.....	27
3.2. A TRPM2 szerkezete, működése.....	27
3.2.1. A TRPM2 biofizikai vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer létrehozása..	27
3.2.2. A TRPM2 Ca ²⁺ -függő szabályozása.....	27
3.2.3. A TRPM2 ADPR-függő szabályozása.....	27
3.2.4. A TRPM2 egyéb modulátorai.....	27
3.2.5. A TRPM2 inaktivációjának mechanizmusa.....	28
3.2.6. A TRPM2 PIP ₂ -függő szabályozása.....	28
4. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK.....	29
4.1. Molekuláris biológia.....	29

4.2. Nukleotidok tisztítása, tisztaságának ellenőrzése.....	29
4.3. Anionok Ca^{2+} affinitásának fluoreszcens meghatározása.....	29
4.4. <i>Xenopus laevis</i> petesejtek izolálása, injektálása.....	30
4.5. Két elektródos voltage-clamp mérések.....	30
4.6. Inside-out patch-clamp mérések.....	30
4.7. Steady state egyedi csatornás patch-clamp mérések kinetikai elemzése.....	32
4.8. Kinetikai modellek statisztikai rangsorolása.....	34
4.9. Egyedi csatornák vezetőképességének meghatározása.....	36
4.10. Makroszkópos áramrelaxációk illesztése.....	36
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS.....	37
5.1. A CFTR szerkezete, működése.....	37
5.1.1. A CFTR moduláris felépítése, domén határok tisztázása.....	37
5.1.2. A CFTR foszforilációs szabályozása.....	41
5.1.2.1. Pozitív vagy negatív regulátorként működik-e az R domén?.....	41
5.1.2.2. Nem-konzervált NBD1 szegmensek szerepe.....	41
5.1.2.3. A 768-as gátló foszfoserin vizsgálata.....	46
5.1.3. Az ATP-függő kapuzási ciklus mechanizmusa.....	49
5.1.3.1. A CFTR kapuzási ciklus nem-egyensúlyi voltának bizonyítása.....	50
5.1.3.2. A CFTR kapuzási konformációváltozásainak termodinamikai jellemzése.....	55
5.1.4. Egy CFTR stimulátor szerkezet-aktivitás vizsgálata.....	60
5.2. A TRPM2 szerkezete, működése.....	75
5.2.1. A TRPM2 biofizikai vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer létrehozása...	75
5.2.2. A TRPM2 Ca^{2+} függő szabályozása.....	78
5.2.3. A TRPM2 egyéb modulátorai.....	81
5.2.4. A TRPM2 inaktivációjának mechanizmusa.....	83
5.2.5. A TRPM2 PIP2-függő szabályozása.....	84
5.2.6. A TRPM2 ADPR-függő szabályozása.....	87
6. SZINTÉZIS: A CFTR ÉS TRPM2 CSATORNA-ENZIMEK ÖSSZEVETÉSE.....	100
6.1. Többsíkú szabályozás.....	100
6.2. Katalízis és kapuzás kapcsoltsága.....	101
6.3. Az aktivitás befolyásolásának alapvető farmakológiai stratégiái.....	103
7. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	104
7.1. A CFTR szerkezete és működése.....	104

7.2. A TRPM2 szerkezete és működése.....	104
7.3. Elméleti eredmények.....	105
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	106
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	108
10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	119
10.1. Az értekezés alapját képező idegen nyelvű közlemények.....	119
10.2. Egyéb idegen nyelvű közlemények.....	121
10.3. Magyar nyelvű közlemények.....	122
10.4. Könyvek, könyvfejezetek.....	122
10.5. Tudománymetriai összesítés.....	122

1. RÖVIDÍTÉSEK

ABC	ATP kötő kazetta (ATP Binding Cassette)
ADP	adenozin-5'-difoszfát (Adenosine-5'-DiPhosphate)
ADPR	ADP-Ribóz
ADPRáz	ADPR hidroláz (ADPR pirofoszfátáz)
AMP	adenozin-5'-monofoszfát (Adenosine-5'-MonoPhosphate)
AMPCPR	α,β -metilén ADPR
AMP-kináz	AMP-függő protein kináz
AMPPNP	adenozin 5'-(β,γ -imido)trifoszfát)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát (Adenosine-5'-TriPhosphate)
ATPáz	adenozin-5'-trifoszfátáz
cADPR	ciklikus ADP-ribóz
CaM-kináz	Ca-kalModulin függő protein kináz
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DNS	DezoxiriboNukleinSav
EGTA	etilén glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-TetraAcetic acid)
GABA	gamma-aminovajsav (Gamma-AminoButiric Acid)
GTPáz	guanozin-5'-trifoszfátáz
HEPES	4-(2-HidroxiEtil)Piperazin-1-EtánSzulfonsav
IBMX	3-IzoButil-1-MetilXantin
K _{ATP}	ATP-függő K ⁺ (csatorna)
LL	Log-Likelihood
MOPS	3-(N-MOrfolino)PropánSzulfonát
NAAD	nikotinsav-adenin-dinukleotid (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide)
NAADP	nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate)
3NB	3-NitroBenzoessav
NBD	nukleotid kötő domén (Nucleotide Binding Domain)
NMDG	N-Metil-D-Glukamin
NPPB	5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoessav (5-Nitro-2-(3-PhenylPropylamino)Benzoic acid)
nudix	nucleoside diphosphate linked moiety X

NUDT9	NUDix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-Type motif 9
NUDT9-H	NUDT9 homológia
PIP ₂	foszfatidil inozitol biszfoszfát (Phosphatidyl Inositol Bisphosphate)
PKA	Protein Kináz A (ciklikus AMP-függő protein kináz)
P _o	nyitvatartási valószínűség (Open Probability)
3PP	3-fenilpropilamin (3-PhenylPropylamine)
R domén	Regulációs domén
RE	regulációs toldalék (Regulatory Extension)
RI	regulációs beékelődés (Regulatory Insertion)
RNS	RiboNukleinSav
ROS	Reaktív Oxigén Származék
Rp-cAMPS	Rp-adenozin 3',5'-ciklikus monofoszfotiorát
SDS-PAGE	nátrium (Sodium)-DodecilSzulfát PoliAkrilamid GélElektroforézis
T5L	TRPM5-like
TLC	vékonyréteg kromatográfia (Thin Layer Chromatography)
TM	TranszMembrán
TMD	TranszMembrán Domén
WT	vad típusú (Wild-Type)
$\Delta G^\ddagger$	aktivációs szabadentalpia változás
$\Delta H^\ddagger$	aktivációs entalpia változás
ΔLL	Log-Likelihood növekmény
$\Delta S^\ddagger$	aktivációs entrópia változás
τ_b	átlagos burst hossz
τ_{ib}	átlagos interburst hossz

2. BEVEZETÉS

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 keresztül víz- és sófelszívódás illetve kiválasztás, hormonszekrécio, 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 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.

2.1. A biológiai membránokon keresztüli transzportfolyamatok biofizikája

A biológiai membránokat alkotó lipid kettősréteg nem átjárható poláros, illetve elektromos töltéssel rendelkező részecskék (ionok) számára. Ugyanakkor, a sejtek, illetve a szervezet működése szempontjából elengedhetetlen ezen anyagok szabályozott felvétele illetve leadása. Az ilyen transzportfolyamatok ellátását elsősorban specializált transzportfehérjék végzik, amelyek szerkezetükkel a lipid kettősréteg teljes vastagságát áthidalják (transzmembrán fehérjék). Termodinamikai szempontból passzív transzportnak nevezzük a szabadenergia-csökkenés irányában történő ("downhill") transzport folyamatokat, amelyek nem igényelnek külső energiaforrást, míg az elektrokémiai gradiens ellenében történő ("uphill") transzportfolyamatokat aktív transzportnak nevezzük. A passzív transzportot végző fehérjék az egyébként spontán transzport sebességét nagyságrendekkel növelik a lipid kettősrétegen át történő diffúzióhoz képest, míg az aktív transzporterek lehetővé teszik a különböző membrán kompartmentek közötti transzmembrán koncentráció-gradiensek felépítését. Kinetikai szempontból a transzportfehérjéket két csoportba sorolják: a klasszikus transzporterek (pumpák) és a transzmembrán pórusok (ioncsatornák, aquaporinok) csoportjaiba.

2.1.1. A transzportfolyamatok klasszikus osztályozása

2.1.1.1. Klasszikus transzporterek (pumpák)

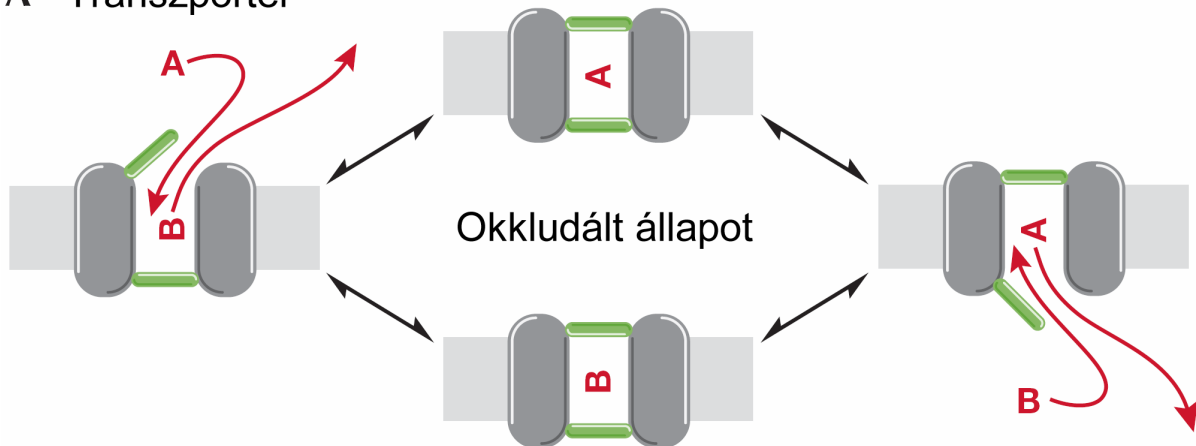
A klasszikus transzporter fehérjék transzmembrán régiói működési ciklusuk során kétféle szélső konformáció között váltakoznak (1. A ábra). A befelé nyitott konformációban a transzporter "belső" (pl. plazma membrán transzporter esetén a citoszolikus) felszínén, a kifelé nyitott konformációban pedig a "külső" (pl. plazma membrán transzporter esetén az extracelluláris) felszínén válik hozzáférhetővé a szubsztrátkötő hely (Jardetzky, 1966). A transzporter egyik szélső állapotából a másikba csak egy köztes "okkludált" állapoton keresztül juthat, amely a szubsztrátot a fehérje belsejébe zárja: ebben az állapotban a szubsztrát egyik oldalról sem hozzáférhető (Beauge és mtsai., 1979; Post és mtsai., 1972). Termodinamikai szempontból a klasszikus transzporterek közé aktív és passzív transzporterek is tartoznak. Passzív "klasszikus" transzporterek az uniporterek, mint például a

vörösvérsejt membrán glukóz transzportere (Glut-1). Az aktív "klasszikus" transzporterek végezhetnek elsődleges vagy másodlagos aktív transzportot: az uphill transzport az első esetben közvetlenül ATP-hidrolízishez (P-, V-, F-típusú, illetve ABC ATPázok), míg a második esetben egy másik szubsztrát downhill transzportjához kötött (csatolt transzport, pl. Na^+/H^+ -cserélő, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cserélő, Na^+ -glukóz kotranszporter; ld. 1. A ábra). A termodinamikai sokféleség ellenére a klasszikus transzporterek kinetikai szempontból hasonlóak: miután minden transzport ciklus csak egy vagy néhány szubsztrátot (iont) juttat keresztül a membránon, a transzportsebességet végsősoron a transzportfehérje globális konformációváltozásainak sebessége határozza meg. Tekintve, hogy az ilyen globális konformációváltozások tipikusan a millisecundum-os időskálán zajlanak, a klasszikus transzportfehérjék átviteli sebessége tipikusan nem nagyobb, mint 10^2 - 10^4 s^{-1} (Gadsby, 2009).

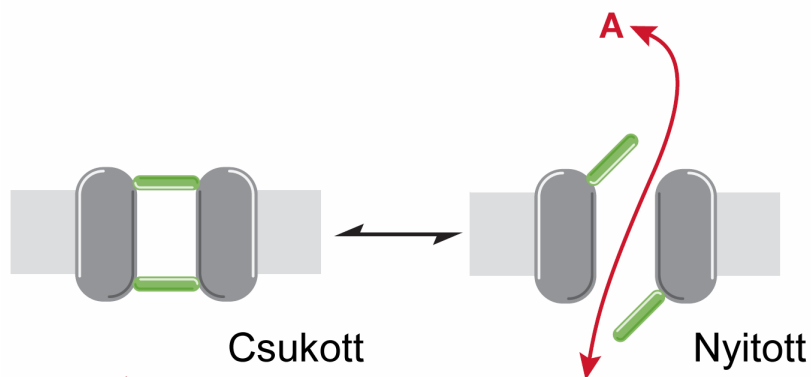
2.1.1.2. Transzmembrán pórusok

A transzmembrán transzportfehérjék egy része rendelkezik olyan konformációval, amelyben a fehérje hossz tengelye mentén a teljes membránt átérő, a két kompartmentet összekötő pórus nyílik meg (1. B ábra). Az ioncsatornák pórusain keresztül szervesen ionok (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), az aquaporinok pórusain keresztül pedig vízmolekulák áramolhatnak passzívan, elektrokémiai gradiensük irányában. Miután ez a fajta transzport nem igényel fehérje konformációváltozást, az átviteli sebességet az elektrodifúzió sebessége határozza meg, amely nagyságrendekkel gyorsabb a "klasszikus" transzportok sebességénél: az ioncsatornáknál például az ionok átáramlási sebessége fiziológiai körülmények között tipikusan 10^6 - 10^8 ion/s (Morais-Cabral és mtsai., 2001). A transzmembrán pórusok azonban nem állnak fenn folyamatosan: a csatornát a fehérje "kapu"-jának sztochasztikus konformáció-változásai nyitják-zárják (1. B ábra). Ez a folyamat (a "kapuzás") viszont megint csak a fehérje konformáció-változások tipikus időskáláján zajlik (azaz a kapu 10^2 - 10^4 -szer nyílik-csukódik másodpercenként). A kapu nyitvatartási valószínűségét (open probability, P_o) különböző csatornák esetén különböző sejtszignálok befolyásolják (pl. membránpotenciál (feszültségfüggő csatornák), extracelluláris ligand bekötődése (ligandfüggő csatornák), foszforiláció, stb.).

A Transzporter



B Ioncsatorna



1. ábra. Transzmembrán transzportmechanizmusok kinetikai felosztása. A, Klasszikus transzporter mechanizmus. A transzportált szubsztát membránon keresztüli mozgását a transzportfehérje jelentős konformáció változásai kísérik. A transzporter két kapuval rendelkezik, és kifelé nyitott (külső kapu nyitva), okkludált (mindkét kapu zárva), illetve befelé nyitott (belső kapu nyitva) konformációk között váltakozik: e konformáció változások sebessége (tipikusan 10^2 - 10^4 s⁻¹) meghatározza a transzportsebességet. **B,** loncsatorna mechanizmus. A transzportfehérje csukott és nyitott konformációk között váltakozik. A nyitott állapotban transzmembrán pórus nyílik meg, amelyen a transzportált ionok elektrodifúzió révén haladnak át. A transzportsebesség és a fehérje konformáció változás ("kapuzás") sebessége függetlenek egymástól.

2.1.2. A klasszikus osztályozás korlátai, a csatorna-transzporter határmezsgye

A fenti merev osztályozás évtizedeken keresztül meghatározta a kutatói szemléletet. Az utóbbi évtizedben azonban egyre több olyan jelenségre derült fény, amely világossá tette, hogy a "klasszikus" transzportfehérjék és az ioncsatornák nem feltétlenül két egymástól gyökeresen különböző fehérjecsoport, hanem működési mechanizmusuk sok szempontból hasonló. Úgyszintén, létezik egy átmeneti csoport is, amely mind csatorna, mind transzporter tulajdonságokkal is bír (Csanády és Mindell, 2008). A Clc fehérjecsalád tagjai között például, a nagyfokú szekvencia homológia ellenére, mind Cl^- csatornák, mind Cl^-/H^+ antiporterek is fellelhetők (Miller, 2006). A CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) klorid ioncsatorna a zömében elsődleges aktív transzportereket tömörítő ABC (ATP Binding Cassette) fehérjék családjába tartozik, és maga is aktív ATPáz (Gadsby és mtsai., 2006). Az EAAT (Excitatory Amino-Acid Transporters) másodlagos aktív transzporter családba tartozó glutamát transzporterek működése során kimutatható egy termodinamikailag nem csatolt passzív Cl^- áram jelenléte (Zerangue és Kavanaugh, 1996). A Na-K ATPáz fiziológias működése során ugyancsak kimutatható egy nem csatolt passzív proton áram (Vedovato és Gadsby, 2014), a palytoxin nevű, tengeri korallokból izolált toxin pedig Na^+ és K^+ ionokra szelektív ioncsatornává változtatja át a pumpát (Artigas és Gadsby, 2003).

A jelenleg egyre inkább elfogadott szemlélet szerint a "klasszikus transzporterek" olyan ioncsatornák, amelyek két kapuval, egy extracelluláris és egy intracelluláris kapuval rendelkeznek (1. A ábra). Ha az intracelluláris kapu van nyitva befelé nyitott, ha az extracelluláris kapu van nyitva kifelé nyitott, konformációról beszélünk; mindkét kapu egyidejű bezáródása jellemzi a köztes "okkludált" állapotot. Az aktív transzporterek alapvető tulajdonsága, hogy a két kapu sohasem lehet *egyidejűleg* nyitva, ez ugyanis transzmembrán pórust, "ioncsatornát" eredményezne (1. B ábra). Ha figyelembe vesszük, hogy egy aktív transzporter $\sim 10^3 \text{ s}^{-1}$ sebességgel katalizálja az "uphill" transzportot, míg egy nyitott póruson keresztüli "downhill" ionáram sebessége $\sim 10^8 \text{ s}^{-1}$, nyilvánvalóvá válik, hogy a két kapu együttes megnyílásának valószínűsége kisebb kell legyen mint $\sim 10^{-5}$, ahhoz, hogy az eredő transzport iránya "uphill" maradjon. Egy transzporter két kapujának egyikét "elrontva" viszont ioncsatornához jutunk: ezt szemléltetik a fenti példák, valamint

erre utal a transzporterek átviteli sebességének és az ioncsatornák kapuzási sebességének hasonlósága is (Gadsby, 2009).

2.1.3. Egyensúlyi és nem-egyensúlyi rendszerek elkülönítésének gyakorlati jelentősége

Az ioncsatornákon keresztüli transzport passzív folyamat, amely nem feltételez külső energiaforrást. Ennek megfelelően a legtöbb ioncsatorna különböző kapuzási konformációi is egyensúlyban vannak egymással, a köztük történő átmenetek reverzibilisek. Néhány ioncsatorna esetén azonban a kapuzási konformáció-változások kifejezett időbeli asszimmetriát mutatnak, ami arra utal, hogy a csatornák kapuzása ciklikus nem-egyensúlyi folyamat. Ilyen mintázatot mutattak ki például a két külön fehérjecsaládba tartozó CFTR (Gunderson és Kopito, 1995) (Jih és mtsai., 2012; Csanády és Torocsik, 2014b) és Clc-0 (Lisai és Maduke, 2008) klorid ioncsatornák esetében is.

A kapuzás egyensúlyi vagy nem-egyensúlyi voltának tisztázása több szempontból is jelentőséggel bír. Egyrészt, bizonyos termodinamikai módszerek, amelyek a csatornák kapuzásának dinamikájáról adnak információt, kizárólag egyensúlyi rendszerek esetén alkalmazhatók. Ilyen például a Rate Equilibrium Free Energy Relationship (REFER) analízis, amely a fehérje szerkezetén végighaladó konformációs hullámok azonosítására alkalmas (Auerbach, 2007). Matematikai úton kimutattam, hogy egyedi-csatornás mérések REFER analízise segítségével semmilyen termodinamikai információ nem nyerhető abban az esetben, ha a kapuzás nincs egyensúlyban (Csanády, 2009). Ezért nem állják meg a helyüket a szakirodalomban a CFTR csatornáról leírt olyan következtetések, amelyek ezen módszerrel kapott eredményekre épülnek (Aleksandrov és mtsai., 2009; Scott-Ward és mtsai., 2007). Másrészt, gyökeresen eltérnek egymástól azok a stratégiák, amelyek segítségével egyensúlyi illetve nem-egyensúlyi rendszerek esetén a csatornák aktivitása (nyitvatartási valószínűsége) legeredményesebben befolyásolható. Egyensúlyi kapuzás esetén a P_o a nyitott állapot(ok) energetikai stabilizálásával növelhető, a csukott állapot(ok) stabilizálásával pedig csökkenthető. Ilyen elven szabályozódnak a ligandfüggő ioncsatornák (például a nikotinerg acetilkolin receptor, GABA, glutamát, és glicin receptorok): a ligand erősebben kötődik a csatorna nyitott állapotában mint csukott állapotában, ezért – a

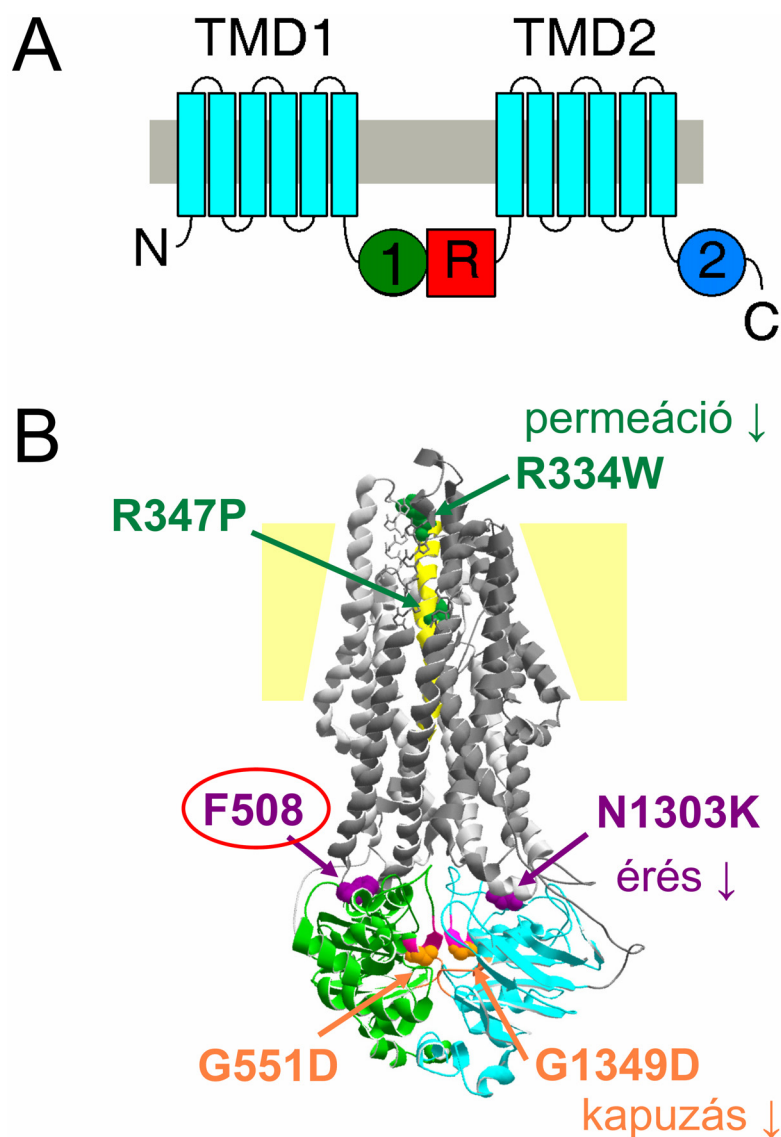
mikroszkópikus reverzibilitás értelmében – a ligand bekötődése stabilizálja a nyitott állapotot a csukotthoz képest (Jackson, 1986). Ezzel szemben, ha a kapuzás irreverzibilis körfolyamat, akkor a nyitott állapotban eltöltött időhányad (a P_o) leghatékonyabban a sebességmeghatározó lépések sebességének, azaz az ezeket meghatározó energiagátak magasságainak befolyásolásán keresztül szabályozható ((Csanády és Torocsik, 2014a); bővebben erről az 5.1.4.-es alfejezetben).

Munkánk során két olyan ioncsatornát tanulmányoztunk, amelyek esetében komolyan felmerült a nem-egyensúlyi kapuzás lehetősége, tekintve, hogy mindkét csatorna esetében a ligandkötő domén enzimatikusan aktív doménnek bizonyult, amely elhasítja a csatornát aktiváló ligandot (Li és mtsai., 1996; Perraud és mtsai., 2001). A következő két alfejezet e két csatornát, a CFTR és a TRPM2 (Transient Receptor Potential Melastatin 2) ioncsatornákat mutatja be.

2.2. A CFTR klorid ioncsatorna

2.2.1. A CFTR élettani és kórélettani szerepe

A CFTR epiteliális klorid ioncsatorna, amely többek között a tüdő alveoláris felszíne, a hasnyálmirigy és a verejtékmirigyek kivezetőcsövei, illetve a bélnyálkahártya hámsejtjeinek apikális felszínén található meg, és döntő szerepet játszik az ezen hámrétegeken keresztüli só-víz transzportban (Pilewski és Frizzell, 1999). A CFTR mutációk okozta működészavarai a cisztikus fibrózis (CF) nevű kórkép kialakulásához vezetnek, amely a leggyakoribb öröklődő halálos betegség a fehér lakosság körében (prevalencia 1/2500). A jelenleg gyógyíthatatlan komplex betegséget a tüdő, bélcsatorna, hasnyálmirigy, és verejtékmirigyek hámrétegeinek felborult só-víz egyensúlya jellemzi, amely sós verejtékhez, emésztési zavarokhoz, illetve visszatérő tüdőfertőzések révén a tüdőszövet fokozatos roncsolódásához vezet. A javuló tüneti kezelések ellenére a betegek életminősége erősen korlátozott, várható élettartamuk pedig ma is csak ~30 év. Számtalan öröklött mutáció okozhatja a CFTR csökkent működését. A leggyakoribb CF allél, az 508-as számú fenilalanin (v.ö. 2. B ábra) delécioja ($\Delta F508$), a CF mutációk ~70%-át teszi ki, így a recesszív öröklésmentnek megfelelően a CF betegek >90%-a rendelkezik legalább egy $\Delta F508$ alléllal (O'Sullivan és Freedman, 2009). A $\Delta F508$ mutáció elsősorban a



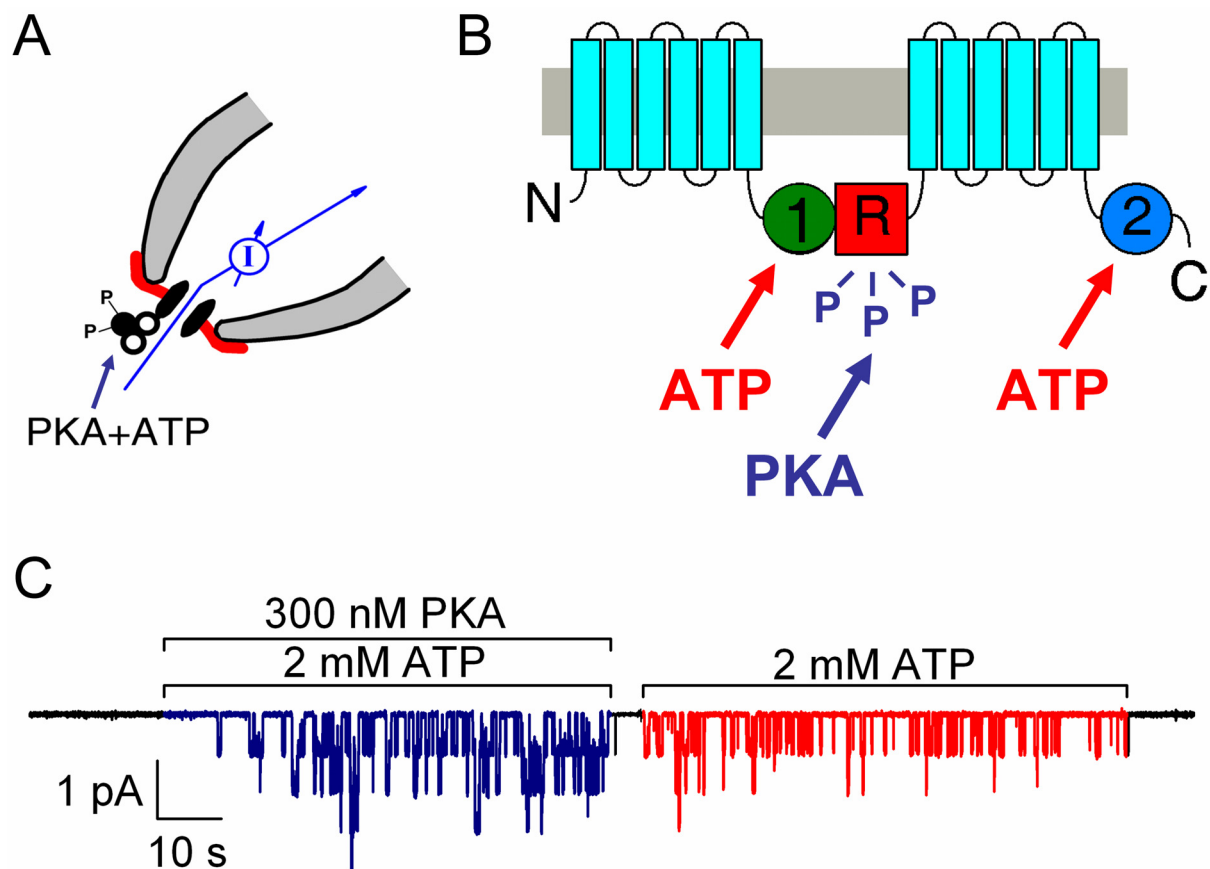
2. ábra. A CFTR csatorna szerkezete. **A**, A CFTR membrán topológiája. A két transzmembrán domént (TMD1, TMD2, világoskék) hat-hat transzmembrán α -hélix alkotja és egy-egy intracelluláris nukleotidkötő domén (NBD1, zöld, NBD2, kék) követi. E két homológ felet köti össze az intracelluláris regulációs domén (R, piros). **B**, A Sav1866 bakteriális ABC transzporter homológ kristályszerkezete (Dawson és Locher, 2006) alapján készült CFTR szerkezeti homológia modell (Mornon és mtsai., 2008), amely nem tartalmazza az R domént. Színkódolás: transzmembrán α -hélixek (szürke), NBD1 (zöld), NBD2 (világoskék), a pórus alkotásában biztosan részt vevő TM6-os α -hélix (sárga). Térkitöltő ábrázolással kiemelt aminosavak: érési (lila), kapuzási (narancssárga), és permeációs (sötétzöld) zavart okozó CF mutációk pozíciói. A leggyakoribb CF mutáció az 508-as fenilalanin deléciója.

fehérje érését zavarja meg, így rendkívül kevés CFTR fehérje jut el a sejtfelszínre (Cheng és mtsai., 1990), emellett azonban súlyosan károsítja a csatorna működését is, csökkentve a pórus nyitvatartási valószínűségét (Miki és mtsai., 2010). Más, ritkábban előforduló CF mutációk a sejtfelszínre kijutó fehérje kapuzását, vagy a nyitott póruson keresztüli klorid ion áramlást (permeációt) zavarják meg (v.ö. 2. B ábra). A CFTR-nek azonban nem csak csökkent működése okozhat egészségkárosodást: a fejlődő országokban még ma is gyakori szekréciós hasmenéseket (pl. kolera) a bélhám CFTR csatornáinak bakteriális toxinok okozta túlműködése idézi elő, amely a bélcsatornán keresztüli nagymértékű só-vízvesztéshez vezet (Thiagarajah és Verkman, 2005).

2.2.2. A CFTR szerkezete, működése

A CFTR az ABC fehérjék C alcsaládjába tartozik (ABCC7), és tipikus ABC molekulaszervezetű (2. A ábra). Egyetlen polipeptid lánc két homológ félből épül fel, amelyeket egy-egy transzmembrán domén (TransMembrane Domain, TMD) és ezt követő intracelluláris nukleotidkötő domén (Nucleotide Binding Domain, NBD) alkot; e két felet egyetlen intracelluláris regulációs (R) domén köti össze (Riordan és mtsai., 1989). A TMD és NBD domének az ABC fehérjék konzervált alkotórészei, míg az R domén egyetlen más ismert fehérje szekvenciával sem mutat homológiát. A növekvő számú ABC fehérje kristályszerkezetnek köszönhetően a "kanonikus" ABC domének térszerkezetéről egyre pontosabb információink vannak (Hollenstein és mtsai., 2007): a membránba ágyazott TMD domének alkotják a szubsztrát transzlokációs útvonalat, amelynek konformációváltozásait az egymással érintkező intracelluláris NBD domének irányítják (2. B ábra). Ezzel szemben az R domén szerkezete teljesen ismeretlen, és CD spektroszkópiás mérések alapján feltételezhető, hogy részben rendezetlen (Ostedgaard és mtsai., 2000).

Az R domén számos konszenzus szerint tartalmaz, amelyek a ciklikus AMP dependens protein kináz (protein kináz A, PKA) szubsztrátjai; ennek megfelelően, a PKA legalább 8 helyen foszforilálja az R domént ((Picciotto és mtsai., 1992); v.ö. 3. B ábra). Defoszforilált állapotban a csatorna inaktív ((Cheng és mtsai., 1991); 3. A és C ábrák), és nyitvatartási valószínűsége a foszforiláció sztöchiometriájával nagyjából arányosan növekszik (Mathews és mtsai., 1998; Csanády és mtsai., 2005b). A PKA mellett más kinázok is képesek a CFTR-t foszforilálni (pl., protein kináz C, CaM-

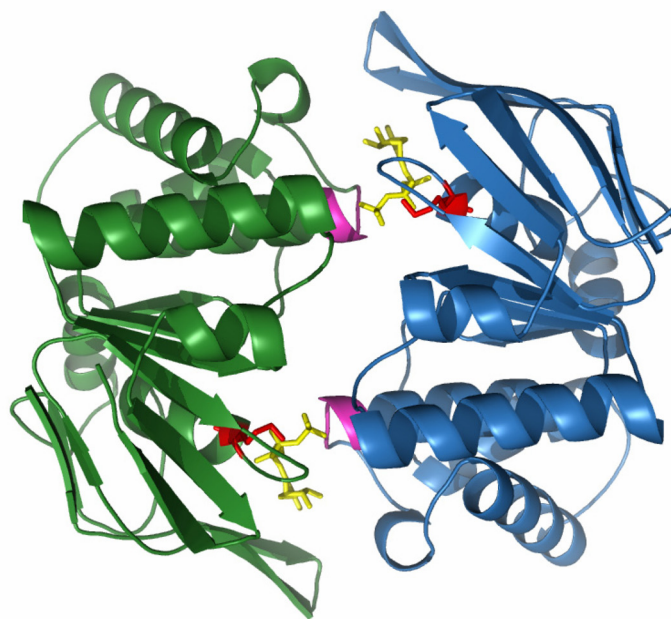


3. ábra. A CFTR csatorna kapuzásának alapvető jellemzői. **A**, A CFTR csatornák kapuzásának vizsgálatára legalkalmasabb a patch-clamp módszer inside-out konfigurációja, amely lehetővé teszi az intracelluláris membránszín közvetlen perfúzióját ATP-t és a PKA aktív katalitikus alegységét tartalmazó oldatokkal. **B**, Az ATP a citoszolikus NBD doménekhez kötődve, a PKA az R domén konszenzus szerinjeinek foszforilációja révén fejti ki hatását. **C**, WT CFTR csatornákat expresszáló *Xenopus* petesejtből kiszakított inside-out patch-ről elvezetett áramregisztrátum. A lefelé irányuló egységnyi kilengések egyedi csatorna pórusok megnyílását jelzik, a patch legalább 4 aktív CFTR csatornát tartalmazott. A PKA fokozatosan aktiválja a csatornákat, a foszforilált csatornák is csak ATP jelenlétében kapuznak.

kináz, AMP-kináz;(Cheng és mtsai., 1991; Picciotto és mtsai., 1992; Hallows és mtsai., 2000), azonban e folyamatok funkcionális jelentősége tisztázatlan.

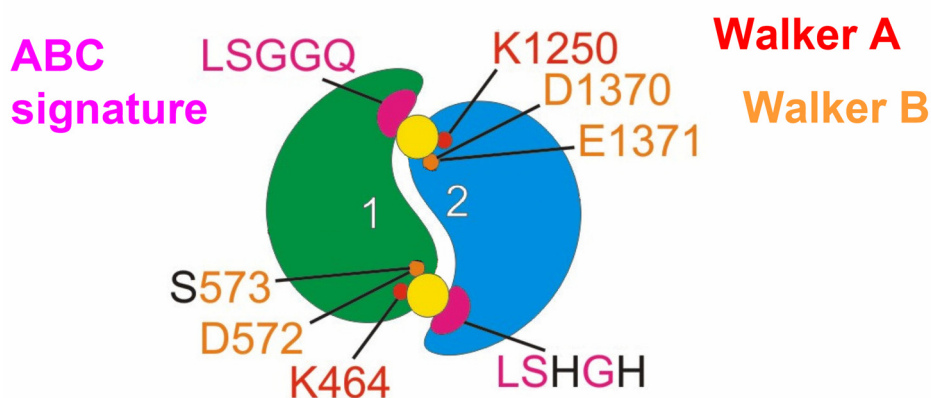
A foszforilált CFTR csatornák pórusának kapuzását a két NBD által katalizált ATP-hasítási ciklus hajtja (Li és mtsai., 1996). Biokémiai kísérletek (Moody és mtsai., 2002) és számos kristályszerkezet (Smith és mtsai., 2002; Chen és mtsai., 2003) bizonyítják, hogy az ABC fehérjék NBD doménjei ATP megkötését követően intramolekuláris dimert képeznek, amely két ATP molekulát zár magába (4. A ábra, sárga pálcikák). Mindkét ATP kötőhelyhez mindkét NBD hozzájárul: az egyik NBD a konzervált Walker A (GXXXXGKS/T; a konzervált lizint a 4. A ábrán piros pálcikák jelzik) és B ($\Psi\Psi\Psi\Psi$ DE, ahol Ψ nagy hidrofób oldalláncú aminosav) motívumokat, a másik NBD a konzervált ABC signature szekvenciát (LSGGQ; 4. A ábra, rózsaszín) szolgáltatja. E dimerek rendkívül stabilak, és csak a két NBD-t mintegy "összeragasztó" ATP molekulák hidrolízisét követően esnek szét (Moody és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2002). A CFTR az ABC-C alcsalád többi tagjához hasonlóan aszimmetrikus (4. B ábra): "1-es" számmal jelölt ATP kötőhelyének (NBD1 Walker A/B + NBD2 signature; 4. B ábra, *lent*) konszenzus szekvenciái atípusosak, így e kötőhely katalitikusan inaktív (Aleksandrov és mtsai., 2002; Basso és mtsai., 2003), és csak a "2-es" kötőhely (NBD2 Walker A/B + NBD1 signature; 4. B ábra, *fent*), amelyet konszenzus szekvenciák alkotnak, aktív ATPáz (Ramjeesingh és mtsai., 1999). Az ABC fehérjék többsége "klasszikus" elsődleges aktív transzporter (ld. 2.1.1.1. alfejezet), amelyek TMD-jai befelé és kifelé nyitott konformációk között váltakoznak. Kristályszerkezetek tanúsága szerint a CFTR-rel rokon ABC exporterekben az ATP-t kötött szoros NBD dimerek kifelé nyitott ((Dawson és Locher, 2006; Ward és mtsai., 2007); v.ö. 5. B és C ábrák), míg disszociált vagy részlegesen disszociált NBD dimerek befelé nyitott TMD konformációval járnak együtt ((Ward és mtsai., 2007; Aller és mtsai., 2009; Hohl és mtsai., 2012); v.ö. 5. A és C ábrák). A CFTR esetében ezzel szemben az NBD dimer ATP kötését követő kialakulása megnyitja, a 2-es kötőhelyen kötött ATP hasítását követő szétesése pedig bezárja, a csatorna transzmembrán pórusát ((Vergani és mtsai., 2005); v.ö. 6. ábra). Ennek megfelelően jelenleg az az általánosan elfogadott nézet, hogy a CFTR valamely ősi aktív transzporterből fejlődött csatornává, oly módon, hogy az ősi transzporter belső kapuja az evolúció során elcsökevényesedett, így kifelé nyitott TMD konformációban is áteresztő marad (Bai és mtsai., 2011).

A



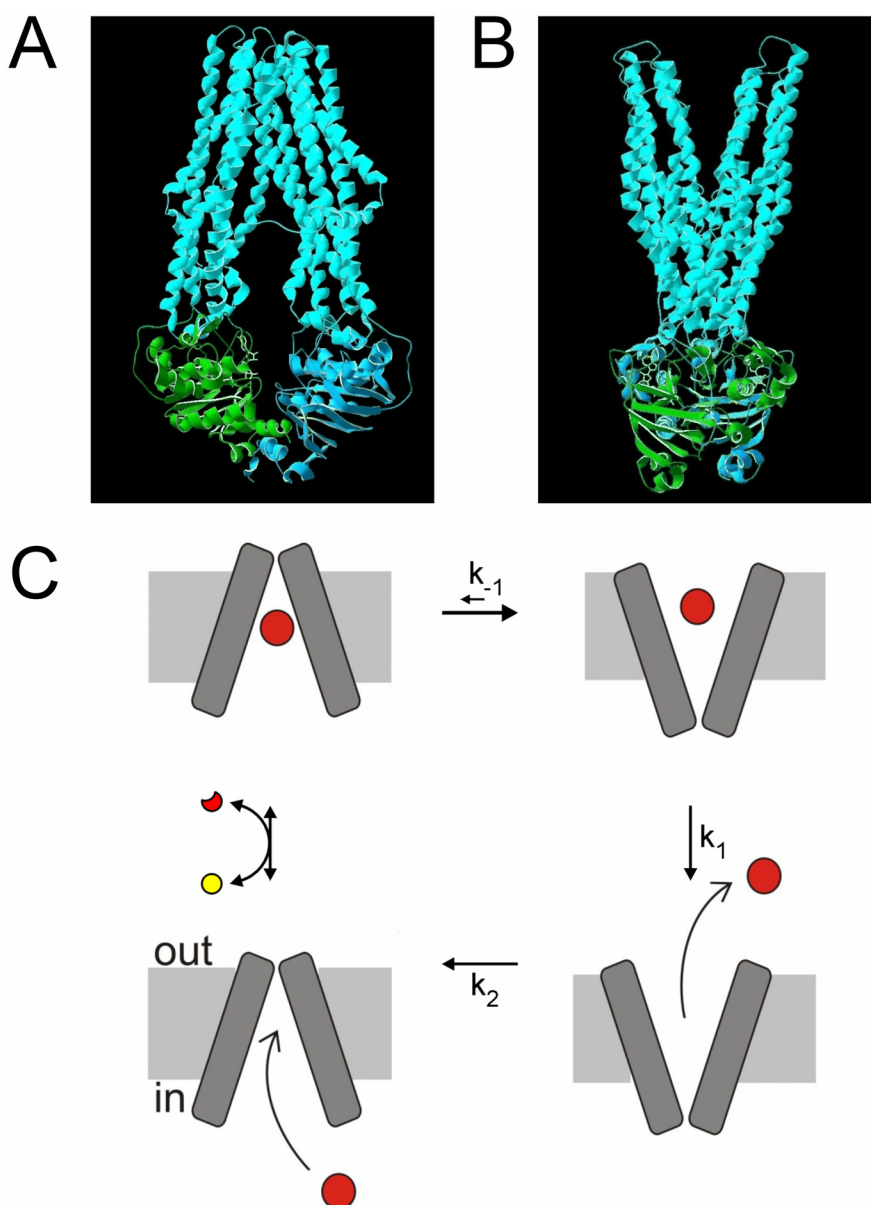
B

aktív (2-es) kötőhely

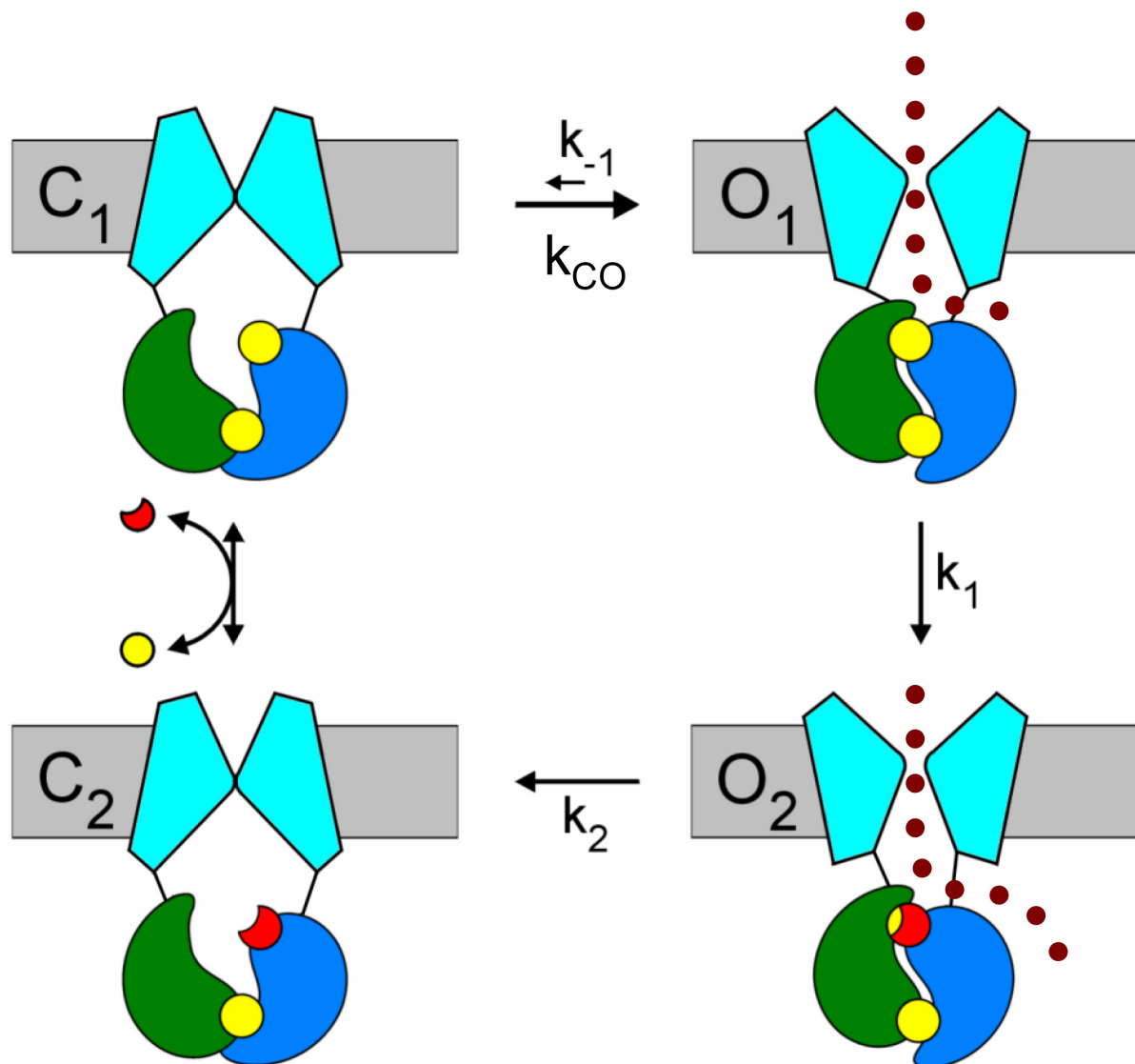


inaktív (1-es) kötőhely

4. ábra. Az ABC fehérjék NBD dimer szerkezete. **A**, A *Methanococcus jannaschii* baktérium lipoprotein exporter komplexe (LolCDE) NBD doménjének (LoID, Mj0796) kristályszerkezete (PDBID: 1L2T). A katalitikus glutamát mutációjának (E171Q) köszönhetően a domén ATP jelenlétében homodimert képez (Smith és mtsai., 2002). ATP, sárga pálcikák, Walker A motívumok, piros, ABC signature motívumok, rózsaszín. **B**, A CFTR NBD1 (zöld) - NBD2 (kék) heterodimerjének sematikus képe. ATP, sárga körök, Walker A lizinek, piros körök, Walker B aszpartát-glutamát pár (az NBD1-ben aszpartát-serin), narancssárga körök, signature motívumok, rózsaszín foltok.



5. ábra. Az ABC transzporterek TMD-jainak átfordulása az NBD dimer kialakulásához/széteséséhez kapcsolódik. **A**, A *Thermotoga maritima* baktérium TM287/288 heterodimer exporterének kristályszerkezete (PDBID: 3QF4). A transzporter NBD dimerje (zöld/kék) az aktív (2-es) kötőhely körül felnyílt, a TMD (világoskék) befelé nyitott konformációban található (Hohl és mtsai., 2012). **B**, A *Staphylococcus aureus* baktérium Sav1866 homodimer ABC exporterének kristályszerkezete (PDBID: 2HYD). A transzporter NBD dimerje (zöld/kék) zárt, a TMD (világoskék) kifelé nyitott konformációban található (Dawson és Locher, 2006). **C**, Az ABC exporterek transzportciklusának sematikus rajza. A szubszttrát (piros kör) a transzporterhez annak befelé nyitott, nagy affinitású konformációjában kötődik, majd kifelé nyitott, kisaffinitású konformációjában válik le arról. Az egyirányú ciklust az ATP (sárga kör) elhasítása hajtja.



6. ábra. A CFTR feltételezett kapuzási ciklusának egyszerűsített sematikus rajza. A foszforilált CFTR csatornák telítési ATP jelenlétében zajló kapuzási folyamatának javasolt mechanizmusa (Vergani és mtsai., 2005). Mindkét NBD "feji végei" (Walker szekvenciái) ATP-t kötnek (C_1 állapot), majd az NBD dimer kialakulása megnyitja a pórust (O_1 állapot). A 2-es (felső) kötőhelyen kötött ATP elhasítása destabilizálja az NBD dimert (O_2 állapot), a dimer szétesésekor a pórus bezáródik (C_2 állapot). Színkódolás: TMD, világoskék, NBD1, zöld, NBD2, kék, ATP, sárga kör, ADP, piros félhold.

A fenti lassú, másodperces időskálán zajló, konformációváltozásokon kívül az egyedi CFTR csatornák áram regisztrátumain megfigyelhetők rövid, ~10 ms időtartamú póruszáródások is, amelyek a hosszú nyitási eseményeket úgynevezett "burst"-ökre szabdalják fel. Ezek a rövid ("flickery") záródások nem mutatnak ATP koncentráció függést, hátterükben valószínűleg kisebb, az ATPáz ciklustól független konformációváltozások állnak (Vergani és mtsai., 2003). A továbbiakban ezért a "nyitási esemény" szó a burst-ök, a "záródási esemény" szó pedig a burst-öket elválasztó hosszú ("interburst") záródások szinonímájaként fog szerepelni. A burst és interburst események hosszának meghatározását a 4.7. alfejezet tárgyalt módszerek teszik lehetővé.

Az anionokra szelektív pórús pontos szerkezeti modellezését nehezíti az alacsony fokú szekvencia homológia a CFTR és rokonainak ezen régiói között. Funkcionális adatok alapján azonban több TM α -hélixről bebizonyosodott, hogy részt vesz a pórús alkotásában. Ezek közül kiemelten vizsgálták a TM1 (Gao és mtsai., 2013; Ge és mtsai., 2004), TM6 ((Bai és mtsai., 2010; Ge és mtsai., 2004; Cui és mtsai., 2012); v.ö. 2. B ábra, sárga α -helix), és TM12 (Bai és mtsai., 2011; Qian és mtsai., 2011; Cui és mtsai., 2012) α -hélixek szerepét. Szintén funkcionális vizsgálatok azonosítottak egy tág intracelluláris vesztibulumot, amelybe nagyméretű pórusblokkoló anionok is beférnek (Zhou és mtsai., 2010), illetve e vesztibulum mélyén egy pozitív töltésű aminosav oldalláncot (K95), amelynek e blokkoló anionok megkötésében van szerepe (Linsdell, 2005). A csatorna kapujának pontos helye egyelőre ismeretlen.

2.2.3. A CFTR szerkezet-funkció kutatások gyakorlati jelentősége

A CFTR kutatás végső célja a cisztikus fibrózisban, illetve szekréciós hasmenésben szenvedő betegek gyógyítása. A CF kutatás távlati gyakorlati célkitűzései a $\Delta F508$ mutáció okozta érési zavar kiküszöbölése, illetve a csökkent csatorna funkció javítása: ilyen hatású "korrektor" illetve "potenciátor" (stimulátor) molekulák fejlesztése jelenleg folyamatban van. Ezzel szemben a szekréciós hasmenések kezelésére a CFTR szelektív gátlása adhatna megoldást (Sonawane és mtsai., 2008).

Az ABC fehérjecsald 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.

2.3. A TRPM2 kation csatorna

2.3.1. A TRPM2 élettani és kórélettani szerepe

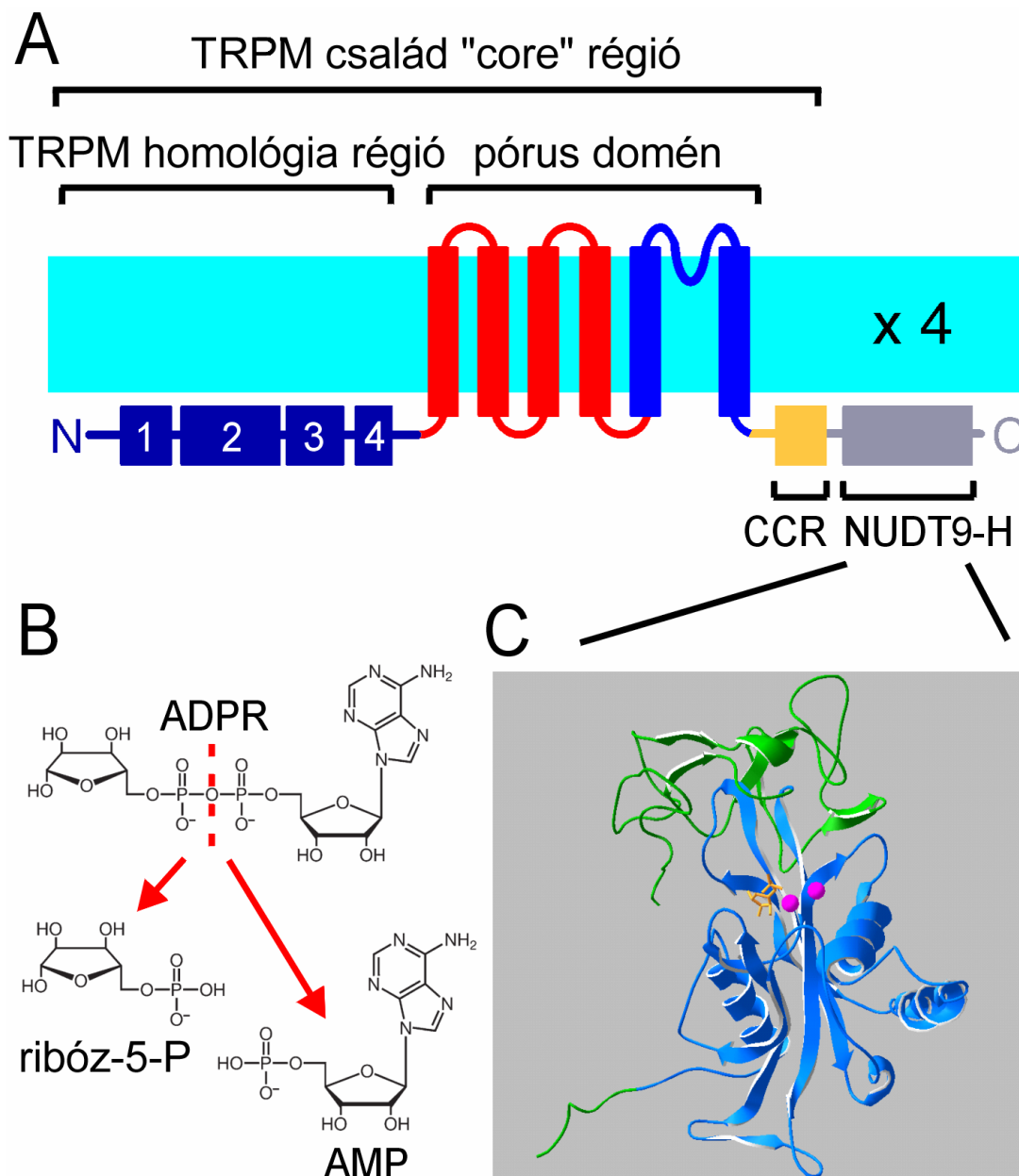
Több élettani, illetve apoptózishoz vezető kórélettani folyamatban szerepet játszik egy Ca^{2+} felvételi út, amelyet reaktív oxigén származékok aktiválnak. A TRPM2 fehérjéről klónozása (Nagamine és mtsai., 1998) után rövidesen kiderült, hogy agyi idegsejtekben, csontvelőben, fagocitákban, a hasnyálmirigy β -sejtjeiben, és szívizomsejtekben alkot oxidatív stresszre aktiválódó Ca^{2+} -permeabilis nem-szelektív kation csatornákat (Perraud és mtsai., 2001; Sano és mtsai., 2001; Hara és mtsai., 2002), amelyek központi szerepet játszanak a fenti folyamatokban. 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 (Yamamoto és mtsai., 2008). A hasnyálmirigy 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 (Uchida és mtsai., 2011).

A TRPM2 aktivitása számos patológiás folyamathoz is köthető, amelyek apoptózishoz vezetnek (Nilius és mtsai., 2007). Agy és szívizom iszkémiát követő reperfúziója ROS termelést vált ki; a következésképpen aktiválódó TRPM2 csatornákon beömlő Ca^{2+} sejthalált okoz (Fonfria és mtsai., 2005). Az oxidatív

stressz és a TRPM2 neurodegeneratív betegségekből, pl. Alzheimer-kórban, is szerepet játszik (Fonfria és mtsai., 2005). Ugyanakkor, amiotrófiás laterálszklerózisban, Parkinson demenciában (Hermosura és mtsai., 2008), és bipoláris zavarban (McQuillin és mtsai., 2006) 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 (Yamamoto és mtsai., 2008), az inzulin szekréció serkentése révén pedig a cukorbetegség és a kongenitális hiperinzulinizmus kezelésében (Uchida és mtsai., 2011) is ígéretes terápiás célpont.

2.3.2. A TRPM2 szerkezete, működése

A TRP (Transient Receptor Potential) fehérje család nagyszámú tagjai kation csatornák, amelyek különféle szenzoros folyamatokban (hideg-, meleg-, fény-, hő-, ízérzékelés) játszanak szerepet, illetve számos sejttípusban hozzájárulnak az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozásához (Nilius és mtsai., 2007). A TRPM2 homotetramer; alegységei hat transzmembrán α -hélixet, illetve nagy N- és C-terminális intracelluláris régiókat tartalmaznak (7. A ábra). Míg a teljes szekvencia kb. felét (kb. 700 aminosavat) kitevő N-terminális régió (7. A ábra, *sötétkék*) szerepe ismeretlen, a C-terminális régiót egy tetramerizációért felelős coiled-coil szakasz ((Tsuruda és mtsai., 2006); 7. A ábra, *narancs*) és egy intracelluláris NUDT9-H domén (7. A ábra, *szürke*) alkotja. Ez utóbbi 50%-ban homológ a vízőldékony mitochondriális NUDT9 enzimmel, amely ADP-ribózt (ADPR) hasít AMP-re és ribóz-5-foszfátra ("ADPRáz"; 7. B ábra). A TRPM2 izolált NUDT9-H doménjáról is leírták, hogy aktív ADPRáz (Perraud és mtsai., 2001; Perraud és mtsai., 2003), és szerkezete jól modellezhető a NUDT9 kristályszerkezete ((Shen és mtsai., 2003); 7. C ábra) alapján. A TRPM2 csatorna transzmembrán régiójának topológiája a feszültségfüggő kation csatorna család konzervált topológiáját követi. Ennek megfelelően a TM1-4 α -hélixek (7. A ábra, *piros*) az úgynevezett feszültségszenzor domént alkotják (Long és mtsai., 2005; Liao és mtsai., 2013); bár a TM4 hélix konzervált pozitív töltéseinek hiánya miatt a TRPM2 kapuzása nem feszültségfüggő. A TM5-6 α -hélixek, valamint a közük ékelődő extracelluláris pórushurok alkotják a kation pórust (7. A ábra, *kék*), amely Na^+ , K^+ , és Ca^{2+} ionokra egyaránt permeábilis



7. ábra. A TRPM2 csatorna doménszerkezete. **A**, A TRPM2 csatorna membrán topológiája. N-terminális domének, *sötétkék*, feszültségszenzor domén, *piros*, pórus domén, *kék*, coiled-coil régió, *narancssárga*, NUDT9-H domén, *szürke*. **B**, A csatornát aktiváló ADPR, illetve az ADPRáz enzimek által katalizált hasítási reakció végtermékeinek szerkezete. **C**, A NUDT9-H doménnel 40% szekvenciahomológiát mutató NUDT9 ADPRáz kristályszerkezete (PDBID: 1Q33). A kristályosítás ribó-z-5-foszfát jelenlétében történt (Shen és mtsai., 2003). Színkódolás: "cap" aldomén, *zöld*, "core" aldomén, *kék*, ribó-z-5-foszfát, *sárga pálcika*, Mg^{2+} ionok, *rózsaszín gömbök*.

(Perraud és mtsai., 2001; Sano és mtsai., 2001). A feszültségfüggő kation csatorna családban a csatornák aktivációs kapuját a TM6 α -hélixek C-terminális, citoszolikus végének négyes kötege alkotja (Long és mtsai., 2005; Liao és mtsai., 2013), emellett inaktivációs kapuként működhet a szűk, extracelluláris szelektáló filter is (Cuello és mtsai., 2010).

A TRPM2 csatornákat a NUDT9-H doménhoz kötődő ADPR aktiválja (Perraud és mtsai., 2001; Sano és mtsai., 2001). Az ADPR a kapocs az oxidatív stressz és a TRPM2 aktiváció között: élő sejtben ROS hatására ADPR szabadul fel a mitochondriumból (Perraud és mtsai., 2005). Intakt sejtekben az intra- és extracelluláris Ca^{2+} is fokozza az ADPR-aktiválta TRPM2 áramot (Perraud és mtsai., 2001; McHugh és mtsai., 2003; Starkus és mtsai., 2007). Emellett intakt-sejtes mérésekben még számos egyéb TRPM2 modulátort is felfedeztek: a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a ciklikus ADP-ribóz (cADPR), valamint a nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP) aktiváló hatásán túl leírták e három agonista szinergizáló hatását is mind egymással, mind az ADPR-zal szemben (Kolisek és mtsai., 2005; Beck és mtsai., 2006). Ugyanakkor az AMP-t intakt-sejtes mérésekben gátló hatásúnak találták (Kolisek és mtsai., 2005).

Kutatásaink kezdetén nem álltak rendelkezésre izolált membránokban, inside-out patch konfigurációban, direkt citoszolikus perfúzió jelenlétében nyert makroszkópos vagy egyedi csatornás mérési adatok, ezért a TRPM2 molekuláris biofizikája teljesen feltérképezetlen volt. Többek között ismeretlen volt az ADPR-aktiváció mechanizmusa és a NUDT9-H domén ADPRáz aktivitásának a kapuzásban betöltött esetleges szerepe, ez az enzimatis aktivitás ugyanis felvetette a kapuzás nem-egyensúlyi voltának lehetőségét. Úgy szintén felderítetlen volt a Ca^{2+} -aktiváció mechanizmusa és az aktiváló Ca^{2+} kötőhelyeinek térbeli elhelyezkedése. Végezetül, tisztázatlan volt, hogy a sok egyéb azonosított modulátor közvetlenül a TRPM2 csatornához kötődve, vagy az ADPR és a Ca^{2+} koncentrációinak befolyásolása révén, közvetetten fejti-e ki hatását.

2.3.3. A TRPM2 szerkezet-funkció kutatások gyakorlati jelentősége

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) hasznosnak bizonyulhat. A TRP család tagjainak sokrétű szerepe miatt azonban egy klinikailag hasznosítható TRPM2 modulátornak mindenekelőtt rendkívül szelektívnek kellene lennie. Mivel a NUDT9-H domén a TRPM2 egyetlen egyedi fehérje szegmense, ez a domén a legkézenfekvőbb gyógyszer-célpont. Ezért e csatorna-enzim ("chanzyme") domén szerkezetének, pontos szerepének megértése kulcsfontosságú lehet a TRPM2 csatornát célzó szelektív drogok fejlesztésében.

3. CÉLKITŰZÉSEK

3.1. A CFTR szerkezete, működése

3.1.1. A CFTR moduláris felépítése, domén határok tisztázása

Az ABC fehérjék felépítése moduláris, az egyes domének sokszor külön génekről, önálló polipeptid láncként termelődnek, és a transzlációt követően épülnek össze funkcionális transzporterré. Bár a CFTR egyetlen polipeptidláncból áll, szerkezete szintén moduláris (TMD1 – NBD1 – R domén – TMD2 – NBD2; 2. A ábra). Tisztázni kívántuk, hogy előállíthatók-e funkcionális CFTR csatornák külön-külön megtermelt domének összeépülésével. E módszer segítségével ellenőrizni kívántuk a szekvencia alapján jósolt doménhatárok pontosságát.

3.1.2. A CFTR foszforilációs szabályozása

Tisztázni kívántuk, a foszforiláción keresztüli szabályozás mechanizmusát. Alapkérdésünk az volt, hogy a foszforilált R doménnek van-e aktiváló hatása, vagy a nem-foszforilált R domén okoz gátlást. Bár az R domén foszforilációja összességében aktiváló hatású, a 768-as szerinről leírták, hogy ennek 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 $\Delta F508$ -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

A TRPM2 csatorna részletes biofizikai jellemzése érdekében olyan heterológ rendszert kívántunk beállítani, amelyben a humán TRPM2 csatorna izolált membránban vizsgálható a citoszolikus felszín közvetlen perfúziója mellett.

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

Tisztázni kívántuk a TRPM2 csatornát aktiváló Ca^{2+} kötőhelyeinek térbeli elhelyezkedését, illetve a Ca^{2+} -indukálta 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 a kapcsoltság e katalízis és a pórus kapuzása között.

3.2.4. A TRPM2 egyéb modulátorai

Tisztázni kívántuk, hogy a H_2O_2 , az AMP, a cADPR, illetve az NAADP közvetlenül a TRPM2 csatornához kötődve fejtik-e ki a pórus kapuzását moduláló, intakt sejtekben leírt hatásait.

3.2.5. A TRPM2 inaktivációjának mechanizmusa

Tisztázni kívántuk a TRPM2 csatornák inside-out patch-ben, ADPR és Ca^{2+} fenntartott jelenlétében tapasztalható gyors inaktivációjának 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.

4. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

4.1. Molekuláris biológia

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

4.2. Nukleotidok tisztítása, tisztaságának ellenőrzése

Nukleotidok (ADPR, cADPR, NAADP, NAAD, NAD, ATP, ADP, AMP) tisztaságát vékonyréteg kromatográfiával (TLC) ellenőriztük. E célból 10–100 nmol nukleotidot vittünk fel Polygram SIL G/UV254 TLC lemezekre (Macherey-Nagel), amelyeket 70% (v/v) etanol, 30% (v/v) H₂O, 0.2 M NH₄HCO₃ oldószerkeverékben futtattunk. A szétválasztott nukleotidokat UV fény alatt tettük láthatóvá. A cADPR (Sigma) törzsoldat jelentős ADPR szennyeződését enzimatikusan bontottuk el (nucleotide pyrophosphatase type I (P7383; Sigma)), majd a 24 kDa molekulásúlyú enzimet 3kDa vágópontú szűrő (Z629367; Sigma) segítségével távolítottuk el.

4.3. Anionok Ca²⁺ affinitásának fluoreszcens meghatározása

A glukonát anion Ca²⁺ iránti affinitását kalibrált Ca-green 5N fluoreszcencia segítségével, titrálósos kísérletekben határoztuk meg (Grynkiewicz és mtsai., 1985; Csanády és Torocsik, 2009), a K_d ~20 mM-nak adódott. Ennek megfelelően 140 mM-os Na-glukonát oldathoz adott néhány μM Ca²⁺ esetén a Ca²⁺ ionok ~1/8-a marad szabad állapotban; azaz a mikromoláros Ca²⁺ koncentráció tartományban a glukonát optimális Ca²⁺ pufferként működik. Szubmikromoláros Ca²⁺ koncentrációkat EGTA alkalmazásával állítottunk elő (kalibrált FURA-2 fluoreszcencia segítségével becsült K_d ~282 nM). A 4.6. alfejezetben részletezett Na-glukonát alapú kád oldatok szabad Ca²⁺ koncentrációi e fluoreszcens méréseken alapuló becsléseket tükrözik.

4.4. *Xenopus laevis* petesejtek izolálása, injektálása

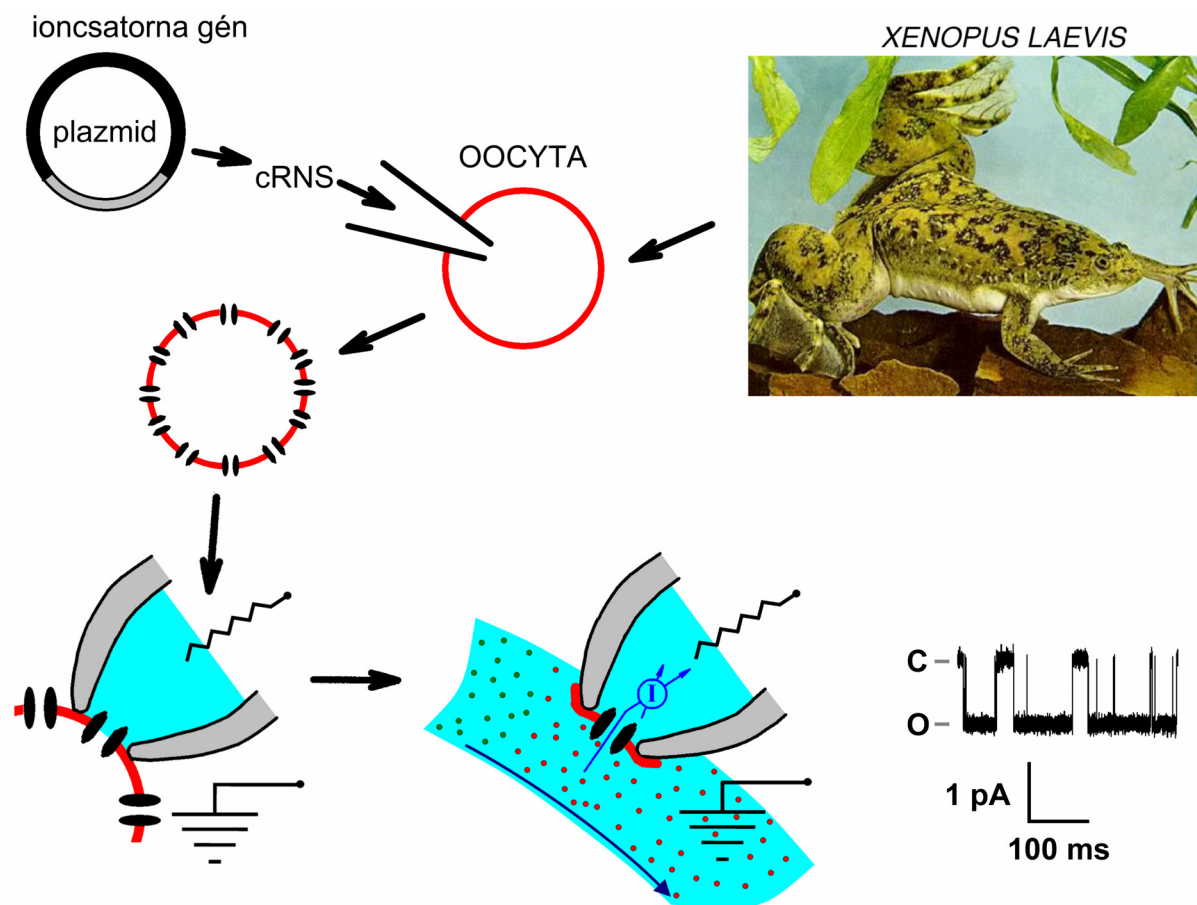
A békapetesejteket hasi metszésből eltávolított petefészek-lebenyekből kollagenázos emésztéssel izoláltuk (Gibco Collagenase Type I), az izolált sejteket 82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES (pH=7.5), 50 mM gentamicin-szulfát tartalmú inkubáló oldatban, 18°C-on tároltuk. A tisztított cRNS-t az izolálást követő napon mikroinjektálással juttattuk a sejtekbe. A bejuttatott RNS mennyisége a kívánt expressziós szinttől függően 0.1-10 ng volt, fix 50 nl-es térfogatban. A két elektródos voltage-clamp illetve inside-out patch-clamp méréseket az injektálást követő 1-3. napon végeztük (8. ábra).

4.5. Két elektródos voltage-clamp mérések

A folyamatosan áramló kád oldat Ca²⁺ mentes Ringer oldat volt, a teljes oldatcsere időtartama <8 s. A mérőkamra 2.5% agar/3 M KCl sóhidakkal kapcsolódott az aktív föld áramkörhöz. A mikroelektrodák 3 M KCl oldattal voltak töltve, ellenállásuk 0.5–2 MΩ volt. Az áramokat szobahőn (~22°C), OC-725A oocyte clamp (Warner Instrument Corp.) erősítővel regisztráltuk, és 50 Hz sávszélességen, 100 Hz mintavételi frekvenciával digitalizáltuk (Digidata 1200 analóg-digitális konverter, pCLAMP 6 szoftver). Az endogén protein kináz A útvonal aktiválása céljából az intakt petesejtek cAMP szintjét a folyamatosan áramló kád oldathoz adott 1 mM IBMX (3-izobutil-1-metilxantin) + 50 μM forskolin alkalmazásával emeltük meg. Az aktivált konduktanciákat a feszültség-áram karakterisztikák -60 és -20 mV közötti meredekségeként adtuk meg, a nem-stimulált nyugalmi konduktanciát levontuk.

4.6. Inside-out patch-clamp mérések

Az egyedi illetve makroszkópos ioncsatorna áramokat a petesejtekből kiszakított inside-out patch preparátumokból vezettük el. A patch citoszolikus felszínét folyamatosan perfundáltuk (8. ábra), a citoszolikus oldat összetételét számítógép-vezérelt elektronikus szelepek segítségével ~30 ms időállandóval tudtuk cserélni. A méréseket 25°C-on végeztük. A boroszilikát patch pipetták



8. ábra. A *Xenopus* oocita heterológ expressziós rendszer. A humán (CFTR vagy TRPM2) ioncsatornát kódoló cDNS-t tartalmazó, *E. coli*-ban szaporított, majd tisztított plazmidról in vitro transzkripcióval cRNS-t állítunk elő. A tisztított cRNS-t afrikai karmosbékából (*Xenopus laevis*) izolált petesejtekbe mikroinjektáljuk, amelyek lefordítják a számukra idegen üzenetet, azaz megszintetizálják és plazma membránjukba juttatják a humán ioncsatorna fehérjét. E sejtek felszínéről izolált ~1 μm átmérőjű membrán foltokban (inside-out patch) található ion csatornák elektromos aktivitása egyedi molekula felbontással regisztrálható, miközben a csatornák intracelluláris felszínét mosó, folyamatosan áramló kádoldat összetétele gyorsan (időállandó ~30 ms) cserélhető.

ellenállása 2-5 M Ω volt, míg a pipetta és a membrán közötti ellenállás általában >100 G Ω .

A CFTR csatornára irányuló mérésekhez az extracelluláris (pipetta) oldat 136 mM NMDG-Cl-ot (N-metil-D-glukamin klorid), 2 mM MgCl₂-ot, 5 mM HEPES-t (pH=7.4), az intracelluláris (kád) oldat pedig 134 mM NMDG-Cl-ot, 2 mM MgCl₂-ot, 5 mM HEPES-t, és 0.5 mM EGTA-t (pH=7.1) tartalmazott.

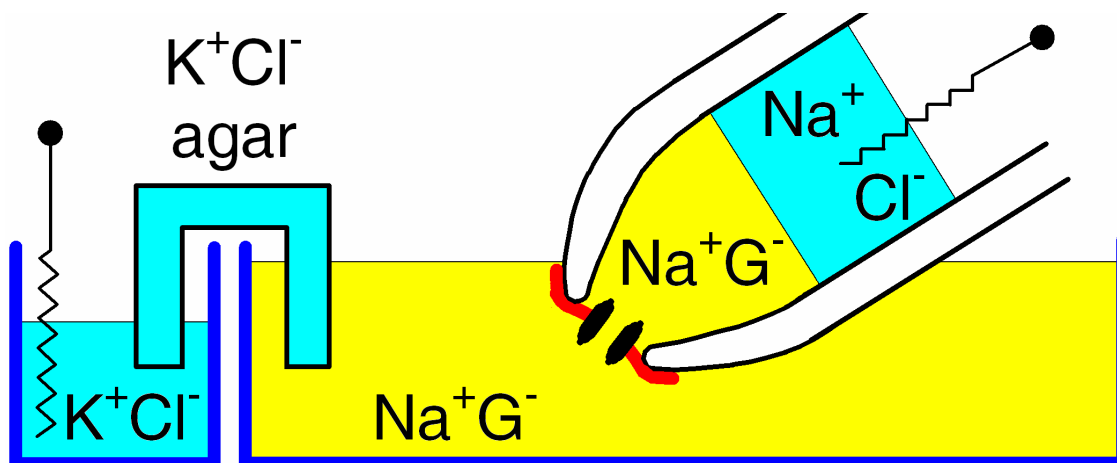
A TRPM2 csatornára irányuló mérésekhez a patch pipetta hegye kb. 1 cm magasságig a következő oldattal volt feltöltve: 140 mM Na-glukonát, 2 mM Mg-glukonát₂, 10 mM HEPES (pH=7.4); 1 mM extracelluláris [Ca²⁺] elérése céljából ehhez még 8 mM Ca-glukonát₂-ot adtunk. A pipetta hátsó, ezüst/ezüst-klorid elektródot tartalmazó, felét óvatos rárétegzéssel 140 mM NaCl-alapú oldattal töltöttük fel. A kád oldat 140 mM Na-glukonátot, 2 mM Mg-glukonát₂-ot, és 10 mM HEPES-t (pH=7.1) tartalmazott, amelyet 4.4, 7.6, 14.8, 43.6, 125, és 398 μ M végső szabad [Ca²⁺] elérése céljából 0, 32, 100, 320 μ M, 1 mM, és 3.2 mM Ca-glukonát₂-tal, illetve 8, 30, 100, 300 nM, és 1 μ M szabad [Ca²⁺] elérése céljából 1 mM EGTA mellett 0, 70, 240, 500, és 760 μ M Ca-glukonát₂-tal egészítettünk ki. A kád elektród 140 mM KCl-be merült, amelyet sóhíd kötött össze a kád oldattal (9. ábra).

A felerősített (Axopatch 200B erősítő) áramokat 2 kHz-en szűrtük, 10 kHz mintavételi frekvenciával digitalizáltuk (Digidata 1322A), a digitalizált adatokat merevlemezen rögzítettük (Pclamp 9).

4.7. Steady state egyedi csatornás patch-clamp mérések kinetikai 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. E célból az ioncsatorna áramokat 100 Hz (CFTR áramok) illetve 200 Hz (TRPM2 áramok) sávszélességgel szűrtük, félamplitúdó módszerrel idealizáltuk, és az így kapott eseménylistákhoz kinetikai modelleket illesztettünk.

Egyedi csatornák "burst" eseményeinek eloszlását klasszikus burst-analízissel állítottuk elő: ez az eljárás egy rögzített, a záródási idő eloszlás alapján



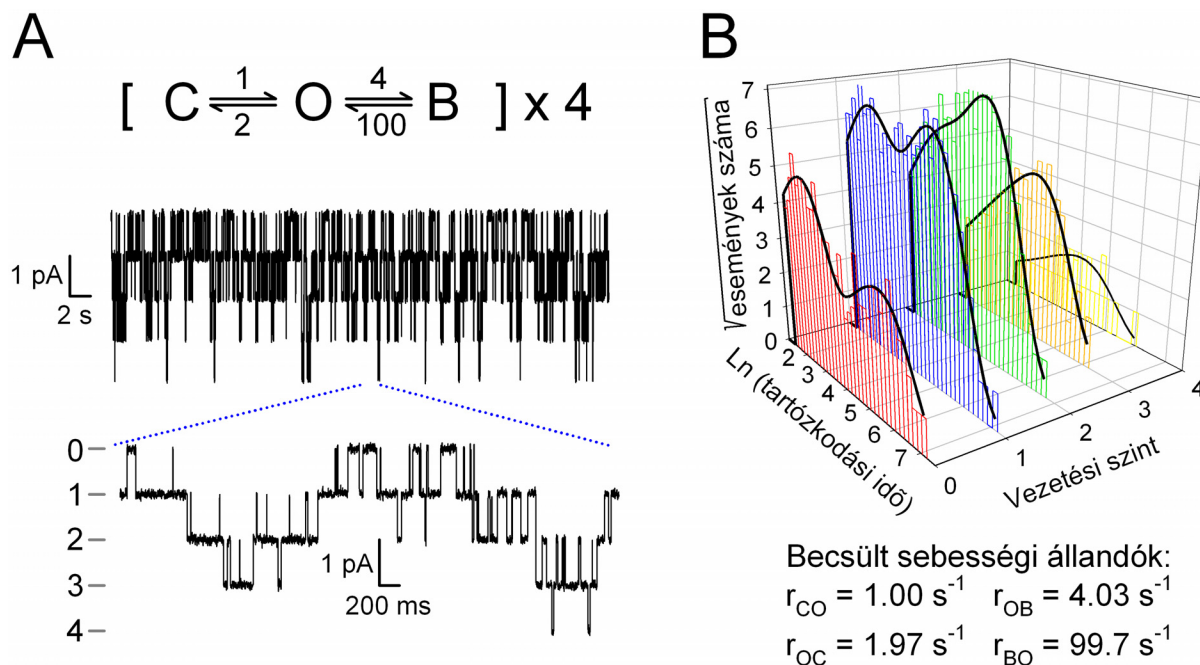
9. ábra. A TRPM2 csatornák *Xenopus* oocyta membránban történő szelektív vizsgálatára alkalmas mérési rendszer. A Ca^{2+} -aktivált endogén klorid áramok kiküszöbölése céljából az inside-out patch membrán mindkét felszínét érő oldatban a klorid ionokat glukonát (G^-) ionok helyettesítik (sárga kompartmentek). A másodfajú Ag/AgCl pipetta- illetve kádelektrodok (cikkcakk vonalak) klorid (Cl^-) alapú oldatokba (világoskék kompartmentek) merülnek. A kád elektódot sóhíd kapcsolja a patch citoszolikus felszínével érintkező kád oldathoz. A pipetta elektród a pipetta végét kb. 1 cm magassáig megtöltő glukonáttartalmú oldatra óvatosan rárétegzett kloridtartalmú oldatba merül. A két pipetta oldat diffúzió révén történő keveredése lassú folyamat: méréseink alapján a klorid ionok 1 órás mérés alatt sem jutnak el a patch citoszolikus felszínéig, illetve ez idő alatt nem változik meg számottevően a két oldat határán fellépő diffúziós potenciál sem. A glukonát ionok egyúttal Ca^{2+} pufferként is működnek, μM -os tartományban hatékonyan stabilizálják a szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -t (Csanády és Torocsik, 2009).

számolt, vágási értéknél rövidebb záródási eseményeket töröl az eseménylistából (Jackson és mtsai., 1983).

A CFTR és TRPM2 csatornák lassú kapuzási kinetikája miatt egyetlen aktív csatorna csak rendkívül hosszú mérési idő alatt szolgáltat elegendő eseményt a megbízható illesztéshez, viszont több, akár 8-10 csatornát tartalmazó patch-ekben is még tisztán feloldhatók az egyedi kapuzási események (v.ö. 10. A ábra). Munkánk kezdetekor azonban nem állt rendelkezésre hatékony módszer több aktív csatornát tartalmazó patch regisztrátumok ilyen célú elemzésére. Ezért kidolgoztam egy maximum likelihood alapú matematikai eljárást, amelynek segítségével az egyedi csatornák kapuzási paraméterei megbízhatóan meghatározhatók olyan patch regisztrátumokból is, amelyek több mint egy aktív csatornát tartalmaznak. A módszer lényege az összes vezetési szinthez tartozó tartózkodási idő eloszlások együttes illesztése a megfelelő kapuzási sémával (10. B ábra). További előnye, hogy egyúttal lehetőséget ad a véges sávszélesség okozta torzulások kompenzálására is. Az algoritmust közöltem (Csanády, 2000) és szoftvercsomag formájában meg is valósítottam; e szoftvert azóta több kutatócsoport használja világszerte, segítségével eddig több mint 40 rangos közlemény született. A CFTR és TRPM2 csatornák átlagos burst (τ_b) és interburst (τ_{ib}) hosszainak meghatározása céljából e módszer segítségével a $C \leftrightarrow O \leftrightarrow B$ (closed-open-blocked) sémát illesztettük az eseménylistákhoz (10. A ábra). A CFTR esetében ez a séma a lassú, ATP-függő kapuzást a $C \leftrightarrow O$ alsémába, az ATP-független gyors kapuzást pedig az $O \leftrightarrow B$ alsémába tömöríti. Az illesztés során meghatározott négy sebességi állandó (r_{CO} , r_{OC} , r_{BO} , r_{OB} ; ld. 10. B ábra, *lent*) ismeretében a burst és interburst hosszak kiszámíthatók: $\tau_b = (1/r_{OC}) \cdot (1 + r_{OB}/r_{BO})$, és $\tau_{ib} = 1/r_{CO}$.

4.8. Kinetikai modellek statisztikai rangsorolása

Munkánk kezdetén ugyancsak kidolgozatlan volt alternatív kinetikai modellek statisztikailag korrekt rangsorolása, mert az eseménylisták maximum likelihood illesztése során – a paraméterbecslések mellett – kapott loglikelihood hányados indikátorok eloszlása nem volt ismert. Ezen eloszlások részben elméleti, részben kísérletes meghatározása révén (Csanády, 2006) lehetővé vált a klasszikus



10. ábra. Több aktív csatornát tartalmazó patch áramregisztrátumának kinetikai elemzése. **A**, Bemeneti adatsor: a C(losed) $\leftrightarrow$ O(pen) $\leftrightarrow$ B(locked) kapuzási sémával, a fent feltüntetett sebességi állandókkal szimulált 4 db egyforma, egymástól független csatorna aktivitása. A szimulált regisztrátum 100 Hz sávszélességgel lett szűrve. Az időben széthúzott szakaszon (*lent*) látható, hogy az egyedi csatorna események tisztán feloldhatók. **B**, Az **A** panelben látható regisztrátum egyes vezetési szintjeinek transzformált (Sigworth és Sine, 1987) tartózkodási idő hisztogramjai (*színes oszlop diagramok*; a logaritmusos időtranszformáció csúcsos függvényekké alakítja a monoton csökkenő exponenciális sűrűségfüggvényeket), valamint a saját fejlesztésű maximum likelihood algoritmus által a hisztogram együttesre illesztett sűrűségfüggvények (*fekete vonalak*; (Csanády, 2000)). A négy illesztett paraméter becsült értékei (*lent*) a szűrés okozta adatvesztés ellenére megbízhatóan visszaadják a szimulációhoz használt értékeket (**A** panel, *fent*).

loglikelihood ratio teszt alkalmazása alternatív kinetikai modellek statisztikai rangsorolása céljából (ld. 5.1.3.1. alfejezet és 18. ábra).

4.9. Egyedi csatornák vezetőképességének meghatározása

Az egyedi csatornaáramok nagyságát amplitúdó hisztogramokhoz illesztett többszörös Gauss görbék csúcsainak távolságaként definiáltuk.

4.10. Makroszkópos áramrelaxációk illesztése

Aktiváló ligandok koncentrációinak hirtelen megváltoztatását követő áramrelaxációk kinetikáját illesztett monoexponenciális függvények időállandóival (τ) jellemeztük. A legkisebb négyzetek módszerrel illesztett exponenciálisok időállandójának inverze a relaxáció sebességi állandóját adja.

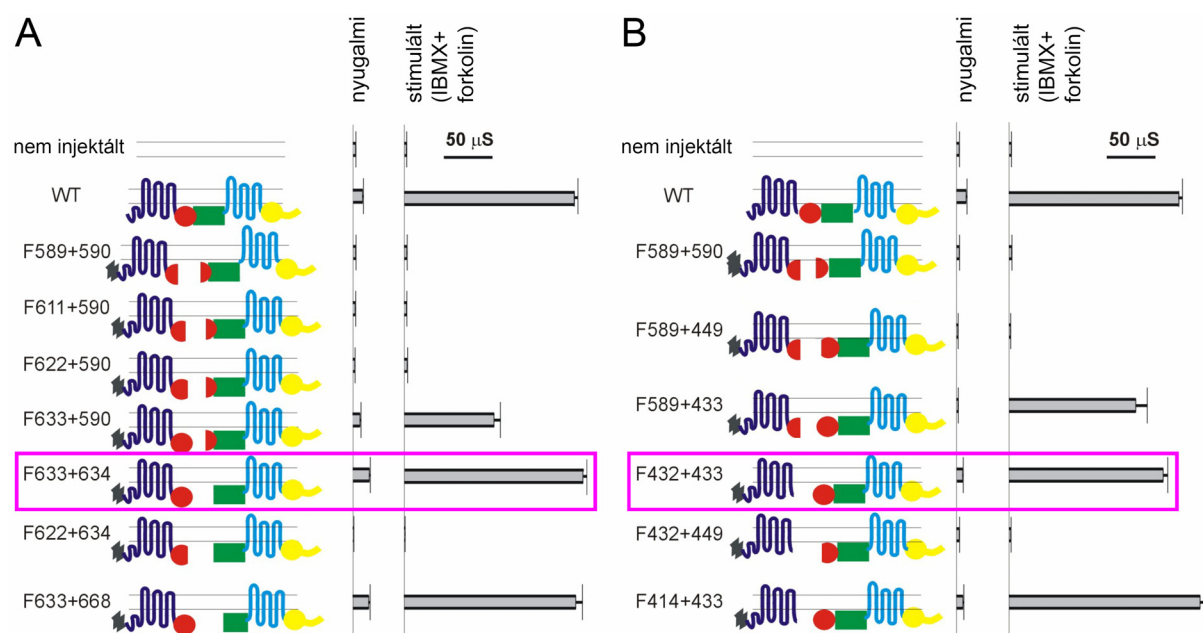
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. A CFTR szerkezete, működése

5.1.1. A CFTR moduláris felépítése, domén határok tisztázása

Sok ABC fehérje esetén a négy "kanonikus" ABC transzporter domént – azaz a két NBD-t és a két TMD-t (2. A ábra) – nem egyetlen polipeptid lánc kódolja, hanem az egyes domének, vagy TMD-NBD domén-párok, külön génekről szintetizálódnak, és a megfelelő sztöchiometriával összeépülve alkotnak funkcionális transzportert. Munkám kezdetén, Dr. David Gadsby laboratóriumában, azt vizsgáltuk, hogy ez a stratégia a CFTR esetében is működik-e, azaz előállíthatók-e funkcionális CFTR csatornák komplementer szegmentsek együttes expressziójával. Miután abban az időben az egyes domének határai sem voltak egyértelműen meghatározva, e módszerrel egyúttal a doménhatárokat is pontosítani akartuk. Ezért különböző helyeken "kettévágtuk" a CFTR szekvenciáját, azaz békapetesejtekben együtt fejeztünk ki két komplementer (vagy közel komplementer) szegmenst.

Első megközelítésként két elektródos voltage clamp technikával mértük az IBMX+forskolin koktéllal aktiválható egész-sejtes CFTR áram nagyságát. Míg a vad típusú (WT) CFTR csatornákat expresszáló petesejtekben nagy, kb. 200 μ S konduktanciájú CFTR áramokat tudtunk kiváltani (11. A ábra, 2. sor), az N-terminális nukleotidkötő domén (NBD1) karboxi-terminális végeként jószolt 589-es pozíciót (Riordan és mtsai., 1989) követő vágás esetén meglepetésre nem keletkeztek működőképes CFTR csatornák (11. A ábra, 3. sor; v.ö. nem-injektált petesejtek, 11. A ábra, 1. sor), ami felvetette, hogy az NBD1 C-terminális határa valójában az 589-es pozíciótól disztálisan található. Valóban, a ko-expresszált N-terminális szegmenst fokozatosan meghosszabbítva (11. A ábra, 4-6. sorok) a 633-as pozíció elérésekor mérhető CFTR áram jött létre (11. A ábra, 6. sor), amely a koexpresszált C-terminális szegmens pontos komplementerré rövidítése esetén megközelítette a WT CFTR áram nagyságát (11. A ábra, 7. sor). Miután e vágott konstrukció aktiválható áramát a 623-633 szakasz kiiktatása megszüntette (11. A ábra, 8. sor), a 634-668-as szakasz kiiktatása viszont nem (11. A ábra, 9. sor), az NBD1 "funkcionális határát" a

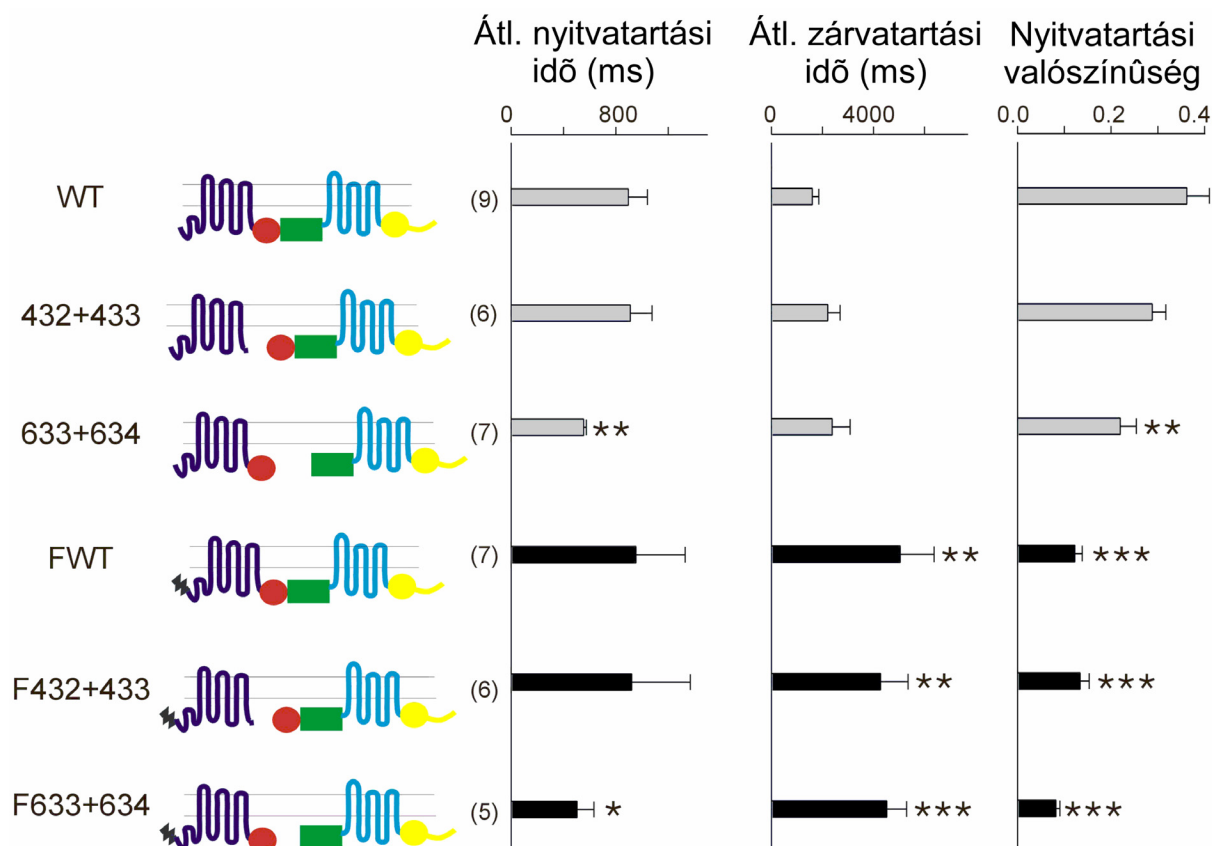


11. ábra. Az NBD1 domén határainak tisztázása koexpressziós módszerrel. A, B, WT CFTR cRNS-sel, illetve különböző cRNS párokkal (*sematikus rajzok*) injektált petesejtekben két elektródos voltage-clamp technikával regisztrált nyugalmi (*bal oldali oszlop diagramok*), és 50 μ M forskolin + 1 mM IBMX alkalmazásával stimulált (*jobb oldali oszlop diagramok*), egész-petesejt vezetőképességek. A vezetőképességek a feszültség-áram karakterisztikák -60 és -20 mV közötti szakaszainak meredekségeiként lettek meghatározva. A sémák színekódolása: Flag-címke, fekete, TMD1, sötétkék, NBD1, piros, R domén, zöld, TMD2, világoskék, NBD2, sárga. A konstrukciók megnevezéséhez használt számok (itt, valamint 12, 13. és 15. ábrákban) az N-terminális szegmens C-terminális, illetve a C-terminális szegmens N-terminális végét jelölik. Pl.: F589+590 = Flag-3-589 szegmens + 590-1480 szegmens. A rózsaszín kerettel kiemelt konstrukciók kapuzását részletesen is megvizsgáltuk (12. ábra).

C-terminális oldalon a 633-as pozíció környékére – a 622-es pozíciótól mindenképpen disztális pontra – jósoltuk.

Hasonló megközelítéssel kívántuk pontosítani az NBD1 N-terminális határát. Az inaktív, 589-es pozíció után vágott konstrukcióból (11. B ábra, 3. sor) kiindulva, a C-terminális szegmenst fokozatosan az N-terminális irányban hosszabbítva (11. B ábra, 4-5. sorok), a 433-as pozíció elérésekor jelent meg először mérhető CFTR áram, amely a koexpresszált N-terminális szegmens pontos komplementerré rövidítése esetén (11. B ábra, 6. sor) megközelítette a WT áramot (11. B ábra, 2. sor). Miután a 415-432 szakaszt kiiktathatónak (11. B ábra, 8. sor), a 433-449 szakaszt viszont nélkülözhetetlennek (11. B ábra, 7. sor) találtuk, az NBD1 "funkcionális határát" az N-terminális oldalon a 433-as pozíció közelébe jósoltuk.

A fenti, intakt sejteken végzett előszűrés (amelyet Dr. Kim Chan kollégám végzett) tehát azt mutatta, hogy az aktiválható CFTR áram nagysága a vágás helyétől függ: ha akár a C-terminális, akár az N-terminális oldalról belevágtunk az NBD1 doménbe, akkor nem kaptunk áramot. Viszont a vad típusú csatornáéhoz hasonló nagyságú áramot kaptunk, ha az NBD1-től akár N-terminálisan (1-432 és 433-1480 CFTR szegmensek koexpressziója), akár C-terminálisan (1-633 és 634-1480 szegmensek koexpressziója) vágtuk el a szekvenciát. Ezt a két "vágott" konstrukciót azután részletesen megvizsgáltuk inside-out patch-clamp mérésekkel is, a PKA aktív katalitikus alegységének perfúziója mellett (v.ö. 3. A ábra; e méréseket mind saját magam végeztem). Makroszkópos mérésekben a vágott csatornák a WT csatornákéval megegyező módon foszforilációfüggőek maradtak, és változatlan érzékenységet mutattak az intracelluláris ATP-vel szemben ($K_{1/2} \sim 50 \mu\text{M}$). Egyedi csatornák szintjén vizsgálva a vágott csatornáknak mind konduktanciái, mind pedig kapuzási kinetikájuk (12. ábra) – mérsékelt kvantitatív különbségeket leszámítva – megegyezett a vad típusú csatornákéval. (Az NBD1 domént követő vágás a nyitvatartási idők mérsékelt rövidítésén, az N-terminálisan elhelyezett Flag-címke pedig a zárvatartási idők mérsékelt megnyújtásán keresztül némileg csökkentette a nyitvatartási valószínűséget; (Chan és mtsai., 2000) 12. ábra.) Hasonlóképpen, működőképes csatornákat eredményezett a TMD1/NBD1/R domén (1-835) és a TMD2/NBD2 (837-1480) szegmensek együttes expressziója is (Csanády és mtsai., 2000).



12. ábra. Az NBD1 domén N- vagy C-terminális oldalán elvágott CFTR csatornák kapuzása a WT csatornákéhoz hasonló. WT CFTR cRNS-sel, illetve különböző cRNS párokkal (*sematikus rajzok*), injektált petesejtekből kiszakított inside-out patch-ekben 300 nM PKA és 2 mM ATP jelenlétében észlelt egyedi CFTR csatorna áramok kinetikai paraméterei (*oszlop diagramok*). A 432-es pozíciót követő vágás (432+433) nem befolyásolja a kapuzást, a 633-as pozíciót követő vágás (633+634) mérsékelten csökkenti az átlagos nyitvatartási időt (*bal oldali oszlop diagram*, 3. és 6. sor). Az N-terminális Flag-címke mindegyik konstrukcióban kb. kétszeresére nyújtja az átlagos zárvatartási időt (*középső oldali oszlop diagram*, 4-6. sor). * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

Megmutattuk tehát, hogy a CFTR előállítható komplementer szegmenseinek koexpressziójával, míg a rész-szegmensek egyike sem képezett önmagában működő csatornát. Továbbá, e módszer alapján az NBD1 domén N-terminális határát a 433-as aminosav környékére, C-terminális határát pedig a 633-as aminosav környékére jósoltuk (Chan és mtsai., 2000): ez jelentős korrekciót jelentett az eredeti, pusztán szekvencia alapján jósolt NBD1 domén határokhoz (433-586) képest (Riordan és mtsai., 1989).

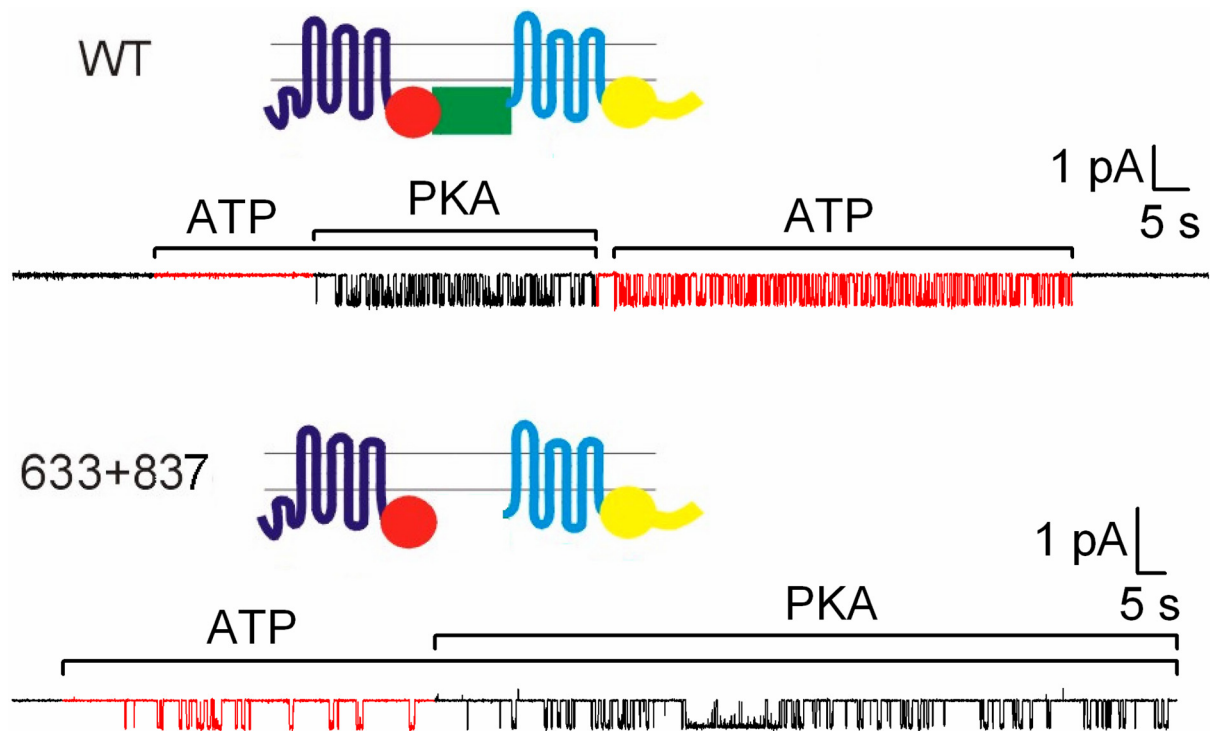
5.1.2. A CFTR foszforilációs szabályozása

5.1.2.1. Pozitív vagy negatív regulátorként működik-e az R domén?

Az előző alfejezetben bemutatott koexpressziós módszer lehetőséget adott a regulációs R domén szerepének vizsgálatára is. Az R domént a protein kináz A foszforilálja, ez a foszforiláció a csatorna-aktivitás előfeltétele: inside-out patch-clamp mérésekben a WT CFTR csatornák nem nyitnak ki a protein kináz A aktív katalitikus alegységének alkalmazása nélkül (13. ábra, *fent*). Tisztázni akartuk, hogy ez a foszforiláción keresztüli aktiváció a nem-foszforilált R domén gátló hatását, vagy a foszforilált R domén serkentő hatását tükrözi. Ezért, még mindig Dr. David Gadsby laboratóriumában dolgozva, a két TMD-NBD páros (TMD1/NBD1: 1-633-as szegmens, TMD2/NBD2: 837-1480-as szegmens) koexpressziójával olyan CFTR csatornákat hoztunk létre, amelyekből hiányzik az R domén (cut- Δ R; 13. ábra, alsó topológia diagram). Azt találtuk, hogy e csatornák működőképeseek, és ATP-függő kapuzásuk a WT csatornákéhoz hasonló. A cut- Δ R csatornák aktivitásához azonban nem volt szükséges előzetes foszforilációra (13. ábra, *lent*), 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 (Csanády és mtsai., 2000).

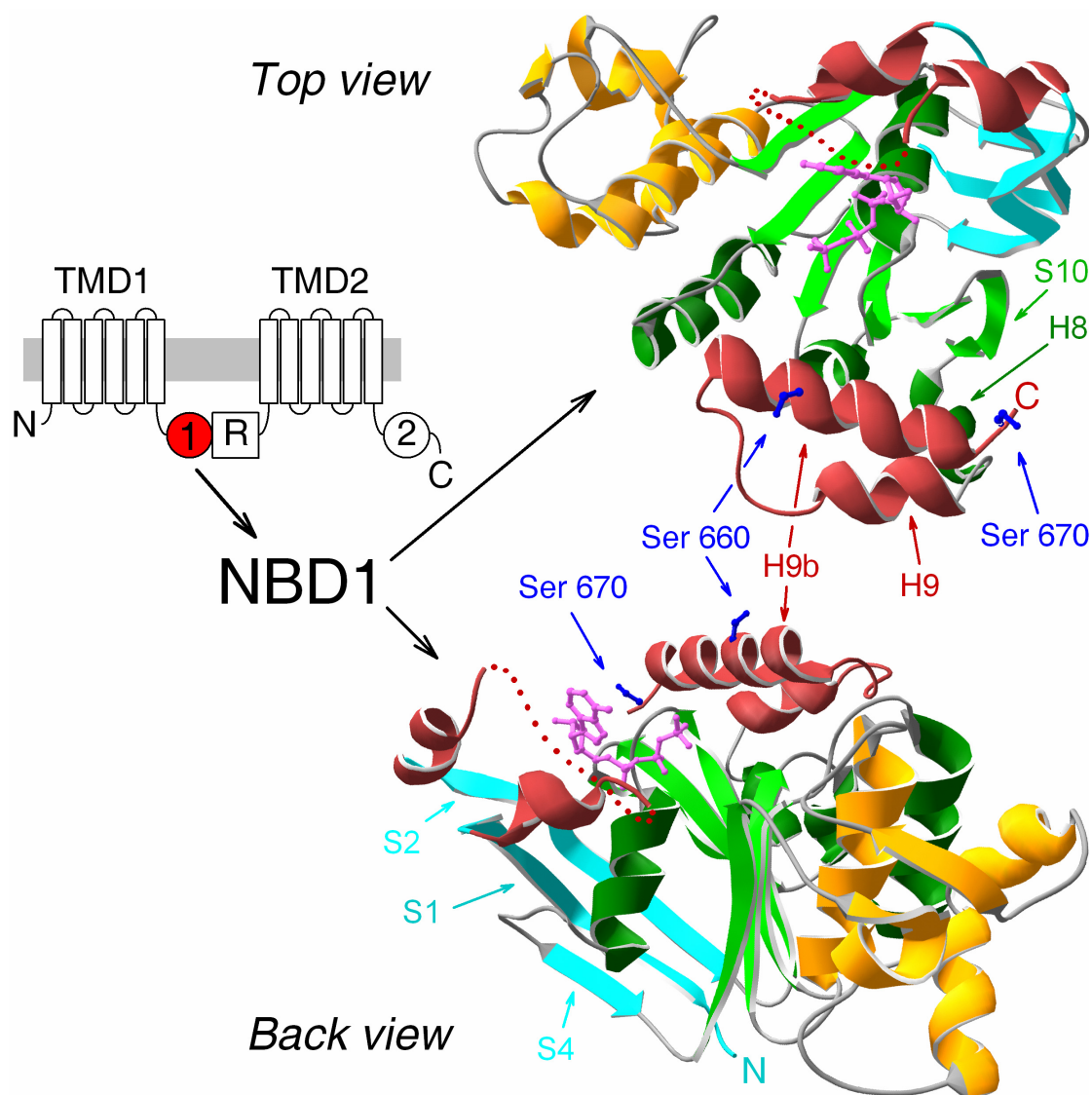
5.1.2.2. Nem-konzervált NBD1 szegmensek szerepe

A CFTR NBD1 domén 2004-ben, Magyarországra történő hazatérésem után, közölt röntgenkristallográfiás szerkezete ((Lewis és mtsai., 2004); 14. ábra) tovább

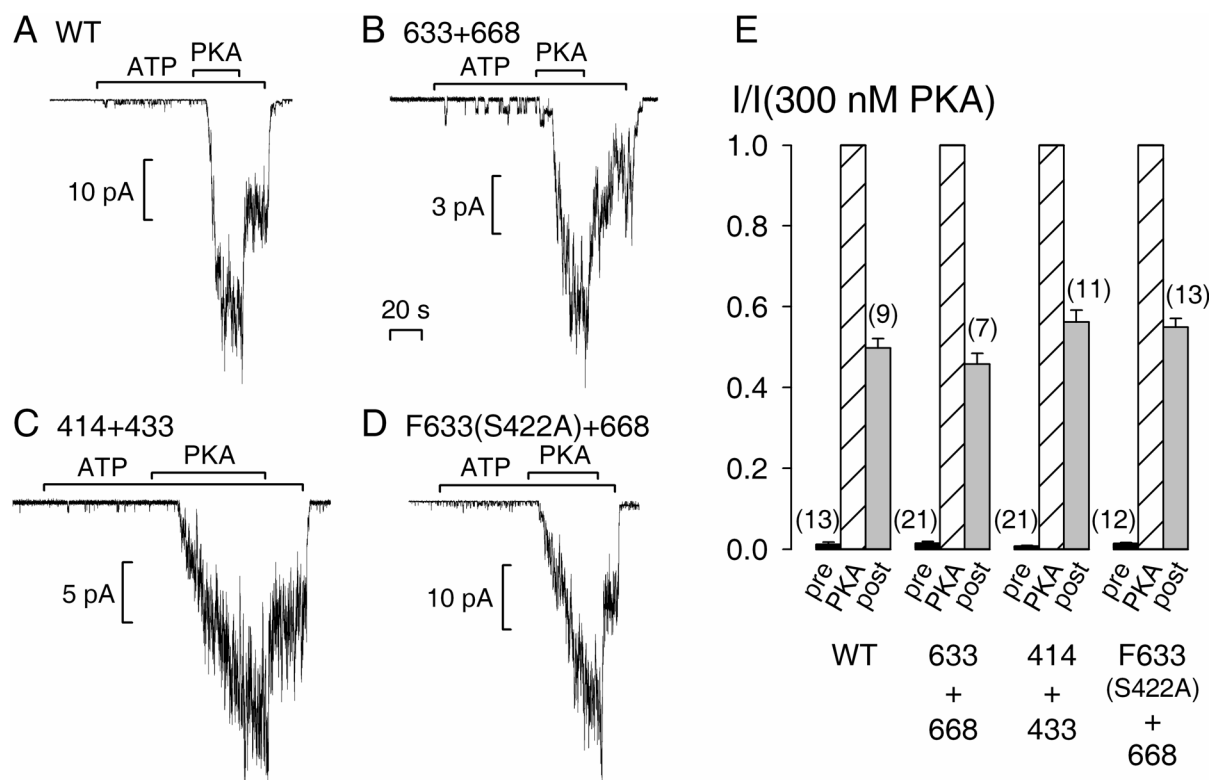


13. ábra. Az R domén deléciója foszforiláció hiányában is aktív CFTR csatornákat eredményez. Egyetlen WT CFTR (*fent*) illetve 1-633 és 837-1480-as CFTR szegmensekből összeépült (633+837, *lent*) csatorna áramregisztrátumai *Xenopus* oocytából kiszakított inside-out patch-ben. Míg a WT csatorna csak PKA alkalmazásával aktiválható, az R domént nem tartalmazó 633+837 csatorna ATP (2 mM) jelenétében a PKA (300 nM) kezelést megelőzően is aktív.

pontosította e domén határait. Kiderült, hogy az NBD1 domént valójában a ~390-638 aminosavak alkotják, azonban a 404-435-ös szakasz a domén N-terminális β -lemezésnek (14. ábra, világoskék) első két β -redője közötti egyedi beékelődés (regulatory insertion, RI), amely egyetlen másik ABC fehérjében sem található meg. Mind az RI, mind az NBD1-et közvetlenül követő hélix-loop-hélix motívum (639-670-es szakasz, regulatory extension, RE) tartalmaz PKA-szubsztrát szerint (S422, illetve S660), és szerkezete foszforiláció-függőnek bizonyult. Ezért a szerzők felvetették, hogy e két szakasz (14. ábra, *piros szegmensek*; az RI egy része a kristályszerkezetben nem volt feloldható, *piros pöttyözött vonal*) fontos szerepet játszhat a CFTR foszforiláció-függő szabályozásában (Lewis és mtsai., 2004). Koexpressziós kísérleteinkhez készült konstrukcióink lehetőséget biztosítottak e két szakasz szelektív deléciójára: az 1-414-es és 433-1480-as szegmensek koexpressziója ugyanis az RI, az 1-633-as és 668-1480-as szegmenseké pedig az RE jelentős részét iktatja ki (" Δ RI" és " Δ RE" csatornák) – ugyanakkor korábbi munkánk alapján e deléciók működőképes csatornákat eredményeztek (v.ö., 11. A és B ábrák legalsó sorai). Ezért, már itthoni munka keretében, inside-out patch-clamp kísérletekben részletesen megvizsgáltuk e szakaszok kiiktatásának funkcionális hatásait. Sem az RI, sem az RE kiiktatása nem függesztette fel a CFTR aktiváció szigorú foszforiláció-függését: a WT csatornákhöz (15. A ábra) hasonlóan mind a Δ RE (15. B ábra), mind a Δ RI (15. C ábra) csatornák esetén a CFTR áram PKA alkalmazása előtt (nem foszforilált csatornák; 15. B ábra, *fekete oszlopok*) csak ~1%-a volt a PKA jelenlétében mérhető áramnak (teljesen foszforilált csatornák; 15. B ábra, *csíkozott oszlopok*), és a PKA elvonását követően néhány másodperc alatt kb. 50%-ára esett vissza (részlegesen foszforilált csatornák; 15. B ábra, *szürke oszlopok*). (A PKA elvonását követő gyors részleges deaktiváció a WT csatornák jól ismert tulajdonsága, és az R-domén foszfoszerinek egy csoportjának membránhoz kötött foszfatázok általi gyors defoszforilációját tükrözi; a megmaradó CFTR áram nagyságrendekkel lassabb kinetikával csökken tovább.) Továbbá, egyik deléció sem befolyásolta lényegesen a csatornák ATP-függő kapuzását. Nem volt számottevő hatása annak sem, ha az RE deléciójával egyidőben az RI egyetlen foszforilálható szerinjét is kiküszöböltük (1-633(S422A) és 668-1480 szegmensek koexpressziója; 15. D ábra, 15. E ábra jobb oldali oszlopcsoport). Megállapítottuk tehát, hogy sem az



14. ábra. Nem konzervált szakaszok elhelyezkedése a CFTR NBD1 szerkezetben. (Bal) CFTR membrán topológia, az NBD1 domén pirossal kiemelve. (Jobb) Az egér CFTR NBD1 kristályszerkezete MgATP-t kötött formában ((Lewis és mtsai., 2004); PDBID: 1R0X) két különböző nézetben: az ATP-kötő zseb felől (*fent*), illetve a fentivel nagyjából merőleges irányból, a parallel β -lemez (zöld) síkjából nézve (*lent*). A nem-konzervált beékelődés (RI) és toldalék (RE) pirossal vannak kiemelve. Az RI 412-428-as szakasza a kristályszerkezetben nem volt feloldható, e peptidszakaszt piros pontozott vonal helyettesíti. Színkódolás: ABC-specifikus α -helikális aldomén, *sárga*; F1-szerű ATP-kötő "core" parallel β -lemez, *zöld*; ABC-specifikus antiparallel β -lemez, *világoskék*; ATP, *rózsaszín*; 660-as és 670-es szerinek oldalláncai, *kék*.

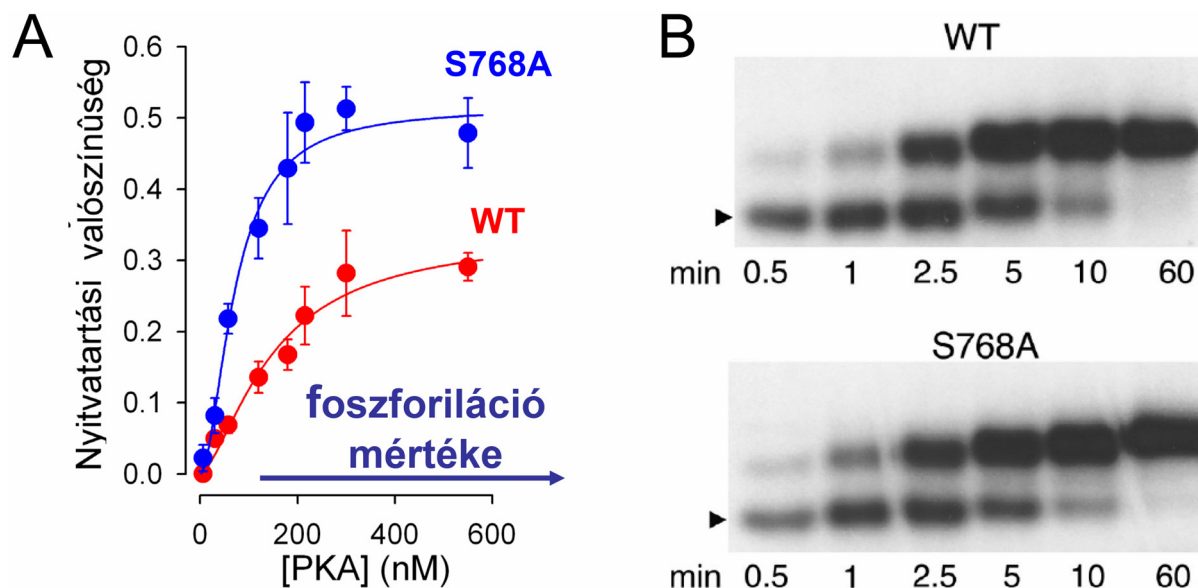


15. ábra. A nem-konzervált NBD1 szegmensek kiküszöbölése nem zavarja meg a CFTR foszforilációfüggő szabályozását. **A-D,** (A) WT, (B) Δ RE (633+668), (C) Δ RI (414+433), valamint (D) Δ RI(S422A) CFTR konstrukciókat expresszáló petesejtekből kiszakított inside-out makro-patch-ekben, -80 mV membránpotenciálon regisztrált makroszkópos CFTR áramok a csatornák három jól elkülöníthető foszforilációs állapotának aktivitását szemléltetik: PKA alkalmazása előtt (nem, vagy alig foszforilált állapot), telítési koncentrációban (300 nM) alkalmazott PKA jelenlétében (teljesen foszforilált állapot), illetve a PKA elvonására bekövetkező gyors részleges defoszforilációt követően (részlegesen foszforilált állapot). **E,** WT, Δ RE, Δ RI, és Δ RI(S422A) CFTR csatornák aktivitása PKA alkalmazása előtt (fekete oszlopok, "pre"), PKA jelenlétében (csíkozott oszlopok, "PKA"), illetve PKA elvonása után (szürke oszlopok, "post"). Az átlagos makroszkópos áramok az ugyanazon patch-ben PKA jelenlétében regisztrált átlagos áramhoz vannak normálva.

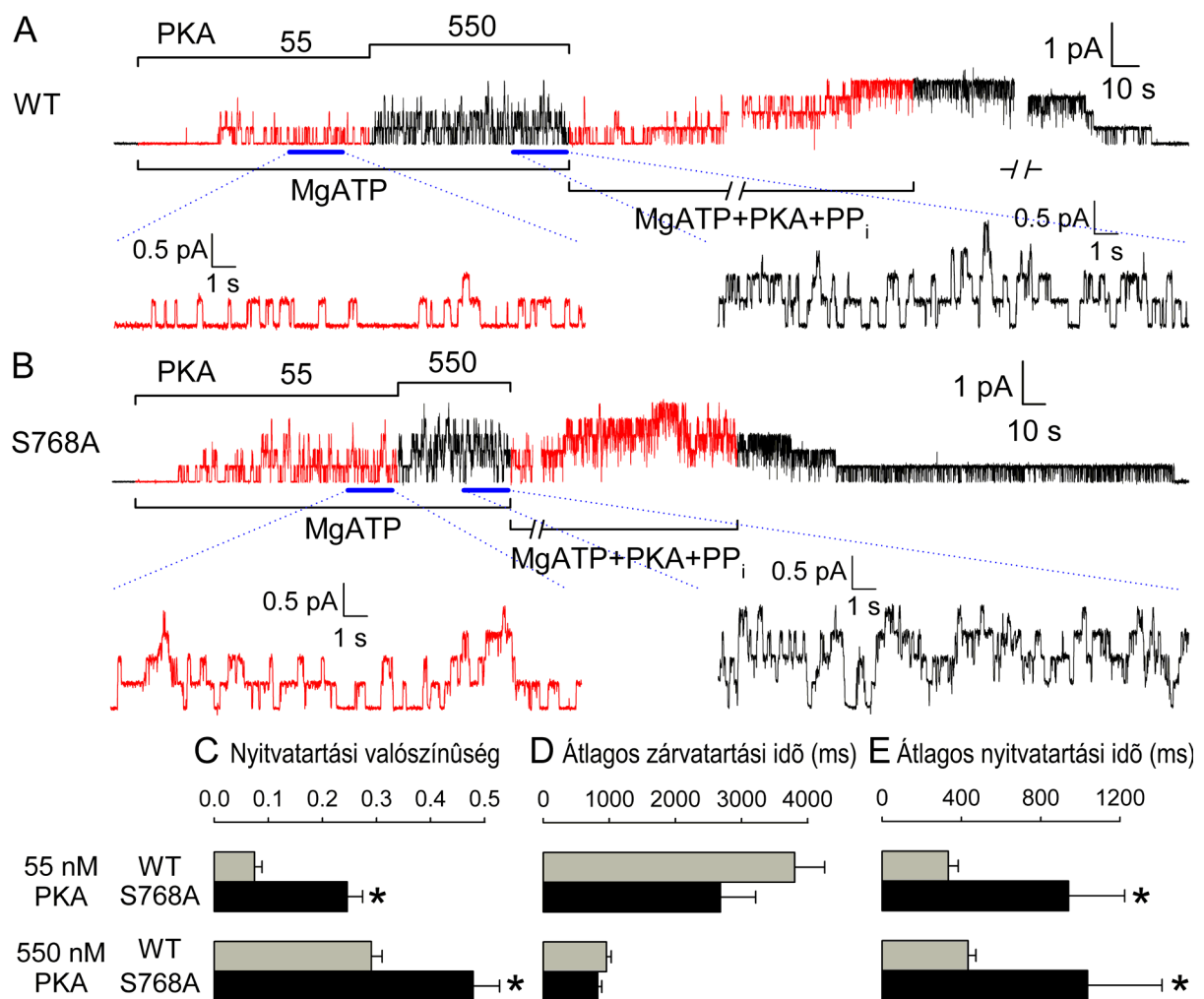
RI, sem az RE szakasz jelenléte nem szükséges a CFTR foszforiláció-függő szabályozásához (Csanády és mtsai., 2005a).

5.1.2.3. A 768-as gátló foszfoszerin vizsgálata

A protein kináz A az R doménben található mintegy tucatnyi szerint foszforilál (Picciotto és mtsai., 1992), és a csatornák aktivitása nagyjából arányosan növekszik a foszforiláció mértékével. E jelenség egyik lehetséges magyarázataként felvetődött, hogy az aktivációt (azaz az R domén gátló hatásának felfüggesztését) egyszerűen a foszfátcsoportok negatív töltéseinek felhalmozódása okozná, valamilyen elektrosztatikus mechanizmuson keresztül. Ennek azonban ellentmondott az a felfedezés, hogy a 737-es és 768-as R domén szerinek oldalláncainak kiküszöbölése (szerin-alanin mutáció) növelte az intakt sejtekben mért CFTR csatornaaktivitást (Wilkinson és mtsai., 1997). A 768-as R-domén szerin szerepének megértése céljából részletesen megvizsgáltuk a 768-as pozícióban nem foszforilálható S768A mutánst. A WT csatornákkal ellentétben az S768A csatornák intakt petesejtekben már nyugalmi állapotban, a cAMP útvonal stimulálása nélkül is, közel maximálisan aktívak voltak; ez az aktivitás azonban PKA gátlószerek (Rp-cAMPS) injektálására elenyészett. Inside-out patchben közvetlenül vizsgálható a csatorna aktivitás foszforilációfüggése, hiszen egy adott patch-ben az alkalmazott PKA és az (állandó) endogén foszfatáz aktivitás egymással ellentétes hatásainak eredményeként a CFTR csatornák foszforilációs szintje (azaz az R-domén szerinek foszforilációs sztöchiometriája) steady-state értékre áll be, amely a PKA koncentráció növelésével emelhető (16. A ábra, *sötétkék nyíl*). Ilyen körülmények között a WT csatornákhöz hasonlóan az S768A csatornák is csak PKA-val voltak aktiválhatók, azonban ehhez alacsonyabb koncentrációjú PKA is elegendőnek bizonyult (16. A ábra): ez a fokozott PKA érzékenység eredményezte az intakt sejtekben mért nagy nyugalmi S768A áramot. Inside-out patch mérésekben egyedi csatornák kapuzási kinetikáját vizsgálva (17. A-B ábrák) megállapítottuk, hogy az S768A mutáció funkcionális hatása pusztán abból áll, hogy megnyújtja a csatornák átlagos nyitvatartási idejét (17. E ábra; v.ö. 17. D ábra), és az ezáltal megnövekedett nyitvatartási valószínűség (17. C ábra) eredményezi a protein kináz A iránti érzékenység látszólagos növekedését (16. A ábra). A velünk kollaboráló Gadsby laboratórium tömegspektrometriás mérésekkel igazolta, hogy nyugalmi sejtekben a



16. ábra. Az S768A mutáció növeli a CFTR csatornák nyitvatartási valószínűségét, de nem befolyásolja a többi R domén szerin foszforilációjának kinetikáját. **A**, Egyedi WT (piros körök) és S768A (kék körök) CFTR csatornák steady-state nyitvatartási valószínűségei inside-out patch-ben, 2 mM ATP és különböző koncentrációjú PKA jelenlétében. Egy adott patch-ben az alkalmazott PKA és az (állandó) endogén foszfatáz aktivitás ellenhatásának eredményeként a CFTR csatornák foszforilációs szintje (azaz sztöchiometriája) steady-state értékre áll be, amely a PKA koncentráció növelésével emelhető (sötétkék nyíl). **B**, C-terminális hisztidin címkével tisztított WT (*fent*) és S768A mutáns (*lent*) R-domén peptidek *in vitro* foszforilációjának időfüggése. Az R-domén peptidek a sávok alatt feltüntetett időtartamú (0.5-60 perc), 10 nM PKA és 5 μ M 32 P-MgATP jelenlétében történt inkubációt követően SDS-PAGE segítségével lettek elválasztva, majd autoradiográfiával előhívva. A nyíl a 28 kDa-os molekulatömeget jelzi. A fokozatos mobilitás-csökkenésben tükröződő R-domén foszforiláció kinetikája nem változott az S768A mutáció hatására. (A leglátványosabb mobilitás-csökkenést a 737-es szerin foszforilációja okozza.)



17. ábra. Az S768A mutáció hatása a CFTR csatornák kapuzási kinetikájára. A–B, Alacsony (55 nM) majd magas (550 nM) koncentrációban alkalmazott PKA ;s 2 mM ATP jelenlétében kialakuló steady-state egyedi csatorna áramok **(A)** WT illetve **(B)** S768A mutáns CFTR csatornákat kifejező petesejtekből izolált inside-out patch-ekben, +40 mV membránpotenciálon. Az aktív csatornák számának (N) meghatározása érdekében a kísérletek végén a csatornákat 300 nM PKA, 0.1 mM ATP és 2 mM pirofoszfát (PP_i) együttes alkalmazásával nyitott állapotban stabilizáltuk; jól látható a nyitvarekedt csatornák nukleotidok elvonását követő lassú záródása (időálló ~30 s, v.ö. átlagos nyitvatartási idő ATP jelenlétében ~250 ms). A csatornák számának (A, N=4; B, N=5) ismeretében a jól feloldató egyedi csatornaesemények (ld. időben széthúzott szakaszok) elemzése a 10. ábrán látható módszerrel történt. **C–E,** Egyedi WT (szürke oszlopok) és S768A (fekete oszlopok) CFTR csatornák steady state nyitvatartási valószínűségei **(C)**, illetve átlagos zárva **(D)** és nyitvatartási idői **(E)** 2 mM ATP és 55 (felső oszloppárok) illetve 550 nM (alsó oszloppárok) PKA jelenlétében. * P<0.05.

WT csatornák 768-as szerinje valóban foszforilálva van, amint ezt az S768A mutáns markáns fenotípusa alapján feltételeztük. Ezzel összhangban, PKA és γ - ^{32}P -ATP jelenlétében foszforilált izolált R domén peptid tömegspektrometriás elemzése kimutatta, hogy a WT R doménban a 768-as szerin foszforilálódik leggyorsabban. Ugyanakkor a többi R domén szerin foszforilációjának kinetikája nem változott az S768A mutáció hatására (16. B ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a WT csatornáknak a 768-as foszfoszerin záródást gyorsító hatása (17. E ábra) nem a többi R-domén szerin foszforilációjának gátlását tükrözi, hanem a kapuzásra kifejtett direkt hatás. Eredményeink alapján a WT csatornáknak a 768-as szerin már alacsony, nyugalmi PKA aktivitás mellett is foszforilálódik, ez a modifikáció pedig a nyitvatartási valószínűség csökkentése révén jobbra tolja el a csatornák aktivitásának foszforiláció-függését. Tehát az egyes foszfoszerinek hatása sokkal komplexebb annál, mintsem hogy egyszerű elektrosztatikus hatással lehessen azokat magyarázni. A jelenség élettani jelentősége nem ismert, feltételezésünk szerint biztosíthatja a CFTR aktivitásának finomabb szabályozhatóságát (Csanády és mtsai., 2005b).

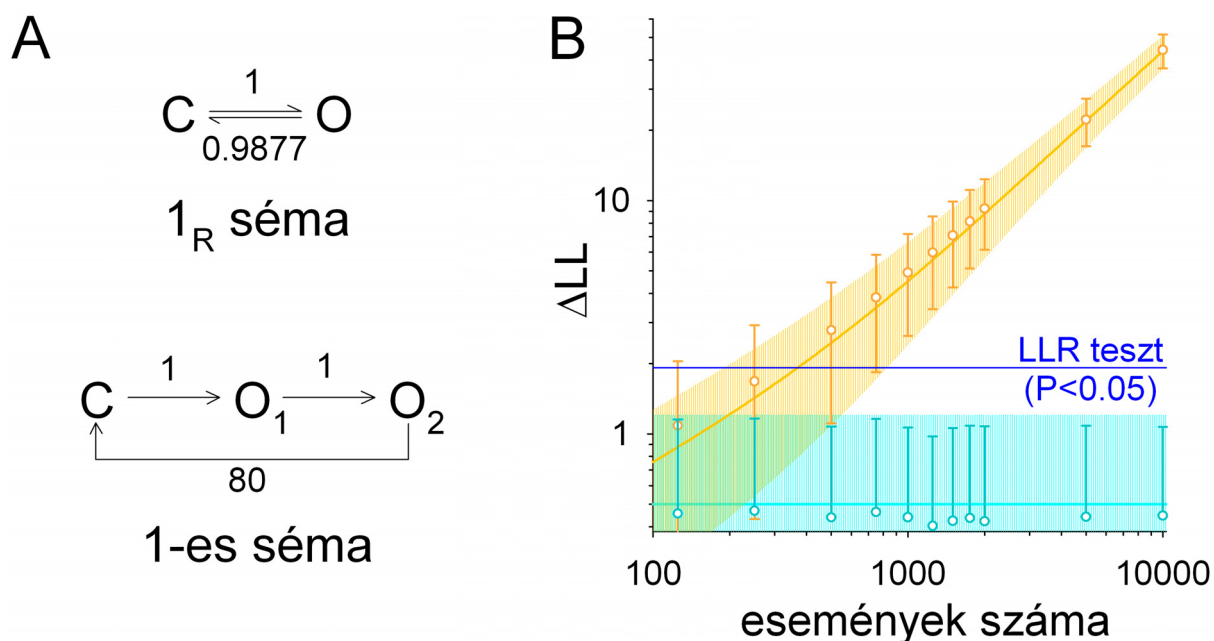
5.1.3. Az ATP-függő kapuzási ciklus mechanizmusa

A foszforilált CFTR csatornák kapuzását a két NBD-hez kötődő ATP hajtja – a csatornák csak ATP jelenlétében kapuznak (pl. 3. C ábra). Alapvető célkitűzésünk volt e kapuzási mechanizmus minél pontosabb megértése. Amint azt a Bevezetés fejezetben felvázoltuk, minden ABC fehérjében az ATP a két nukleotidkötő domén dimerizációját idézi elő (4. A ábra). A dimer két ATP molekulát zár magába a kontakt felszínek által alkotott két kötőhelyen, amelyek az ATP-t elhasítva energizálják az aktív transzportot. A CFTR-ben csak a 2. számmal jelzett kötőhely aktív ATPáz, az 1. kötőhely degenerált (4. B ábra). A Gadsby csoport sok éves munkája révén, amelybe PhD hallgatóként majd itthonról kollaborátorként kapcsolódtam be, olyan kapuzási modell körvonalazódott, amelyben a nukleotidkötő domének dimerizációja nyitja meg a pórust. Mivel a dimer rendkívül stabil (Moody és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2002), a nyitási lépés visszafordítása nagyon lassú: ezt tanúsítja, hogy a 2-es kötőhely hidrolitikus aktivitásának megszüntetése – akár különféle katalitikus hely mutációkkal (pl., K1250R, 21. B ábra; K1250A, 27. B ábra), akár nem-hidrolizálható

ATP analógok (AMPPNP vagy pirofoszfát) alkalmazásával (pl., 17. A-B ábrák) – két nagyságrenddel csökkentik a CFTR csatornák záródási sebességét ($0.03-0.2\text{ s}^{-1}$), azaz "nyitva rekesztik" a csatornákat (Gunderson és Kopito, 1994; Hwang és mtsai., 1994). Ezzel szemben a normális ciklus során a 2. helyen kötött ATP elhasítása destabilizálja a dimert, lehetővé téve annak gyors ($\sim 4\text{ s}^{-1}$) szétesését és a pórus záródását (Vergani és mtsai., 2003; Basso és mtsai., 2003; Vergani és mtsai., 2005). Ez a modell, amelyet több review cikkben is összefoglaltunk (pl. (Gadsby és mtsai., 2006); v.ö. 6. ábra), mára nagy vonalaiban széles körben elfogadott, azonban kezdetben sokáig vitatott volt. Az ioncsatornák döntő többségének kapuzása ugyanis egyensúlyi folyamat, ezért sokan kétségbe vonták, hogy a CFTR esetében ez másképpen lehetne (Aleksandrov és Riordan, 1998; Aleksandrov és mtsai., 2000; Aleksandrov és mtsai., 2009). Bár maga a CFTR által katalizált ATP hidrolízis fiziológiás körülmények között nyilvánvalóan irreverzibilis (azaz nem-egyensúlyi) folyamat, az alapvető kérdés az maradt, hogy a pórus kapuzásának mechanizmusa mennyire szorosan csatolt ehhez az ATPáz aktivitáshoz.

5.1.3.1. A CFTR kapuzási ciklus nem-egyensúlyi voltának bizonyítása

Az egyedi csatornák nyitott illetve csukott állapotban eltöltött tartózkodási időinek eloszlásai egyértelmű lehetőséget biztosítanak a kapuzás nem-egyensúlyi voltának vizsgálatára. A termodinamika törvényeiből következik, hogy egyensúlyi folyamatok esetén (pl. 18. A ábra, 1_R séma, illetve 19. A ábra) ezek az eloszlások monoton csökkenők (v.ö., 19. C ábra) – bifázisos, csúcsos eloszlások (v.ö., 19. D ábra) kizárólag nem-egyensúlyi mechanizmus (pl. 18. A ábra, 1-es séma, illetve 19. B ábra) esetén jöhetnek létre (Kijima és Kijima, 1987). A maximum likelihood illesztés pedig arra is lehetőséget ad, hogy objektív kritériumok alapján eldöntsük, melyik modell illeszkedik jobban a mérési adatokra. Nevezetesen, két egymásba ágyazott modell esetén (azaz, ha az egyszerűbb modell a komplexebb modell részhalmaza (almodellje); v.ö., 18. A ábra 1_R és 1-es séma, illetve 19. A és B ábrák) a komplexebb modell illesztése mindig magasabb log-likelihood (LL) értéket eredményez. Azonban e növekmény (ΔLL , log-likelihood ratio) eloszlása attól függ, hogy melyik modell áll közelebb a valósághoz (18. B ábra; (Csanády, 2006)). Nevezetesen, megmutattuk, hogy amennyiben az egyszerűbb modell a helyes, a

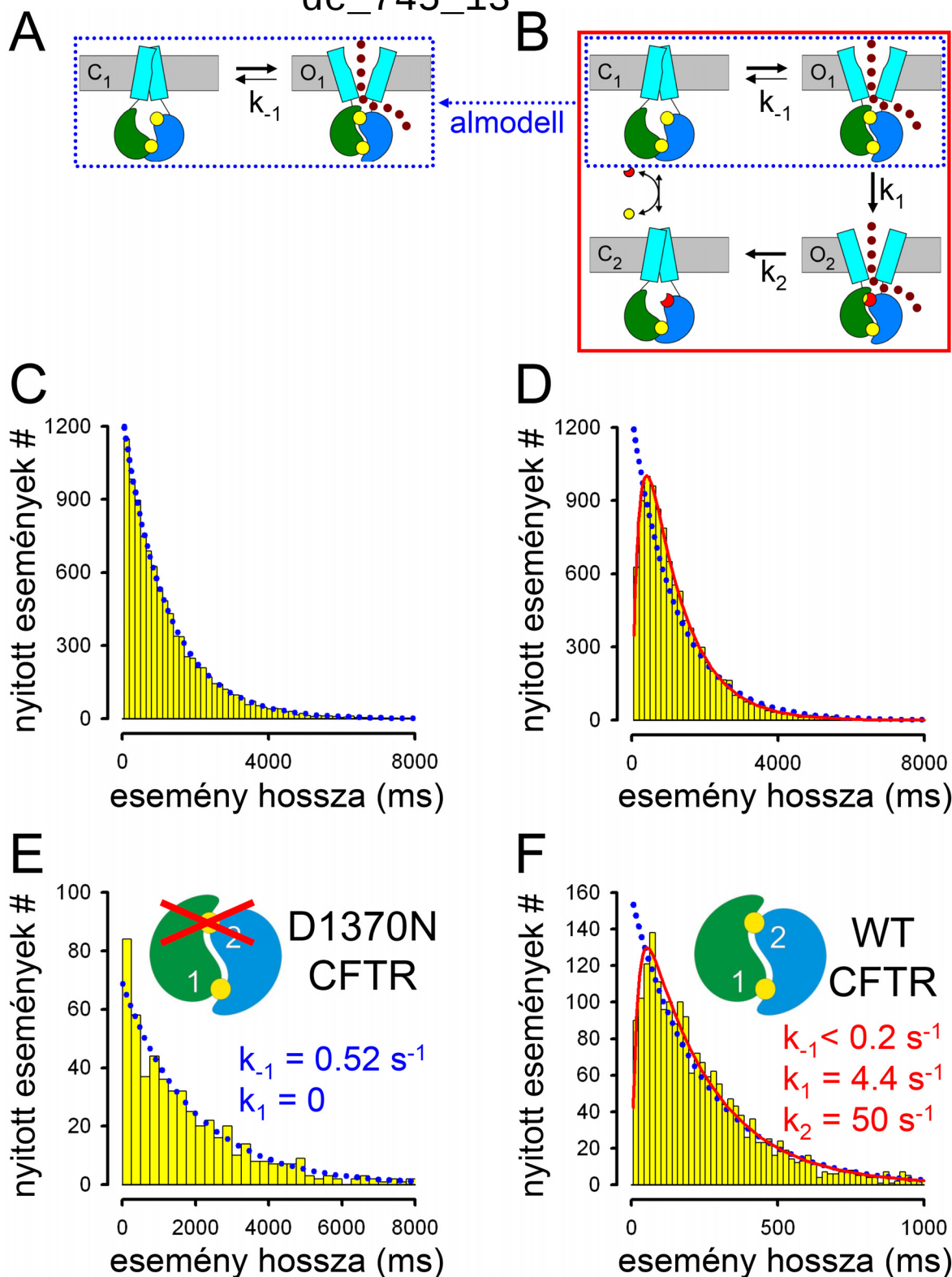


18. ábra. Egymásba ágyazott modellek objektív összehasonlítása a log-likelihood növekmény (ΔLL) értéke alapján. **A**, Két egymásba ágyazott alternatív kapuzási séma. Az 1_R séma az 1-es séma speciális esetének (almodelljének) tekinthető, mert az $O_2 \rightarrow C$ sebességi állandó növelésekor az 1-es séma aszimptotikusan az 1_R sémához közelít. Az 1_R séma (*fent*) egy-paraméteres monoexponenciális (ld. 19. C ábra), az 1-es séma (*lent*) két-paraméteres csúcsos (ld. 19. D ábra) nyitási idő eloszlást jósol. **B**, A ΔLL eloszlásának elméletileg számolt várható értéke (sárga illetve világoskék vonal) és szórása (a sárga és világoskék satírozott sávok a várható érték $\pm$ szórás tartományt jelölik) abban az esetben ha az almodell (világoskék) illetve ha a komplexebb modell (sárga) a valós, az illesztett nyitási események számának függvényében ábrázolva. A kör szimbólumok és hibavonalak mindegyike 1000 db. független szimulált eseménylistának az 1_R majd 1-es sémával történő illesztésekor kapott ΔLL értékek átlagát és szórását mutatják: a szimuláció a világoskék szimbólumok esetén az 1_R, a sárga szimbólumok esetén az 1-es séma alapján történt. A vízszintes vonal a log-likelihood ratio (LLR) teszt $P=0.05$ értékhez tartozó küszöbértékét (x) mutatja: $\Delta LL > x$ esetén <0.05 a valószínűsége annak, hogy az eseménysor az 1_R mechanizmussal jött létre.

ΔLL eloszlása Γ eloszláshoz közelít, és várható értéke (18. B ábra, *világoskék vízszintes vonal*) illetve szórása (18. B ábra, *világoskék satírozott tartomány*) az adatok mennyiségétől független. Ezzel szemben, ha a komplexebb modell helyes, a ΔLL eloszlása aszimptotikusan normál eloszláshoz közelít, melynek várható értéke (18. B ábra, *sárga görbe vonal*) lineárisan, szórása (18. B ábra, *sárga satírozott tartomány*) négyzetgyökösen nő az adatok mennyiségével (Csanády, 2006). A log-likelihood ratio teszt azon alapszik, hogy a ΔLL értékből kiszámolható, mekkora konfidenciával vethető el az a feltételezés, hogy az egyszerűbb modell a helyes: pl. $\Delta LL > 1.92$ esetén az egyszerűbb modell 95% konfidenciával elvethető ($P < 0.05$; 18. B ábra, *sötétkék vízszintes vonal*).

Aleksandrov és mtsai (2009) arra a következtetésre jutottak, hogy a CFTR csatornák kapuzása és az NBD doménekben zajló ATP hidrolízis között nincs kapcsoltság, azaz a kapuzási séma egyszerű egyensúlyi folyamat (19. A ábra): e feltételezés alapján a nyitási idők eloszlása monoton csökkenő kellene legyen (19. C ábra). Ezzel szemben, a Vergani és mtsai (2005) által javasolt kapcsolt séma nem-egyensúlyi körfolyamat, és csúcsos nyitási idő eloszlásokat jósol (19. D ábra). Megjegyzendő, hogy a 19. A ábra egyensúlyi sémája a 19. B ábra ciklusos

19. ábra. A WT CFTR csúcsos nyitási idő eloszlása nem-egyensúlyi mechanizmust bizonyít. A-B, (A) Egyensúlyi lineáris és (B) nem-egyensúlyi ciklusos mechanizmus a CFTR kapuzásának leírására. Az A séma a B séma almodellje (B, *kék pontozott vonal*). C-E, (C) Az A séma alapján szimulált eseménylista illetve (E) egyedi, PKA elvonását követően 2 mM ATP jelenlétében kapuzó D1370N CFTR csatornák nyitási idő eloszlásai (*sárga hisztogramok*), és ezek maximum likelihood illesztései az A sémával ($k_1=0$, 1 szabad paraméter (k_{-1}); *kék pontozott vonalak*). A B sémával történő illesztések egyik esetben sem növelték a log-likelihood indikátor értékét ($\Delta LL=0$). D-F, (D) A B séma alapján, $k_{-1}=0$ választással szimulált eseménylista illetve (F) egyedi, PKA elvonását követően 2 mM ATP jelenlétében kapuzó WT CFTR csatornák nyitási idő eloszlásai (*sárga hisztogramok*), és ezek maximum likelihood illesztései az A ($k_1=0$, 1 szabad paraméter (k_{-1}); *kék pontozott vonalak*), illetve B (2 szabad paraméter (k_1 , k_2); *piros folytonos vonalak*) sémákkal. Bár a B séma illesztése csak 2 szabad paraméterrel történt (k_{-1} értékét 0-ra rögzítettük), az F panelben a log-likelihood növekmény $\Delta LL=18.01$: ennek alapján az egyensúlyi A séma biztonsággal elvethető ($P=2 \cdot 10^{-9}$).



19. ábra. (folytatás)... A lassú k_{-1} sebességi állandó pontos értékéről a nyitási idő eloszlás nem ad információt, erre a különböző katalízis-képtelen mutánsok lassú záródási sebességei (K1250R: $\sim 0.2 \text{ s}^{-1}$, K1250A: $\sim 0.04 \text{ s}^{-1}$, E1371S: $\sim 0.03 \text{ s}^{-1}$; a D1370N mutáció a Mg^{2+} ion kötődésének megzavarása miatt destabilizálja az NBD dimert: $k_{-1} \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$) alapján adtunk felső becslést ($< 0.2 \text{ s}^{-1}$).

sémájának almodellje (19. A-B ábrák, *kék pontozott vonal*), így a modellek a log-likelihood ratio teszt alapján összehasonlíthatók. Ezért egyedi csatornás mérésekből rekonstruáltuk WT és mutáns CFTR csatornák nyitási idő eloszlásait. WT csatornák esetén egyértelműen csúcsos eloszlást találtunk (19. F ábra): a ciklusos modell illesztése (19. F ábra, *piros vonal*) 18.01 egységgel magasabb log-likelihood értéket adott az egyensúlyi modelléhez (19. F ábra, *kék pontozott vonal*) képest, mely utóbbi a log-likelihood ratio teszt alapján nagy biztonsággal kizárható ($P=2\cdot 10^{-9}$). Ezzel egyértelműen igazoltuk a kapuzás nem-egyensúlyi voltát. Ezzel szemben, a 2-es kötőhely katalízis szempontjából kulcsfontosságú Walker B aszpartátjának mutációja (D1370N) hatására az eloszlás monoton csökkenővé vált (19. E ábra), jelezve, hogy az ATP hidrolízis (19. B ábra, $O_1 \rightarrow O_2$ lépés) megszüntetésével ($k_1=0$) a kapuzást csonka egyensúlyi folyamattá (ld. 19. A ábra) redukáltuk. A maximum likelihood illesztések segítségével becsült k_1 és k_2 sebességi állandók (19. F ábra, *piros számok*) és a különféle hidrolízisre képtelen CFTR mutánsok lassú záródási sebességeiből becsült k_{-1} érték ($<0.2\text{ s}^{-1}$) összevetése alapján 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 ($k_1 \sim 0.9\text{ s}^{-1}$), ugyanakkor destabilizálja az NBD dimert ($k_{-1} \sim 3.4\text{ s}^{-1}$), így a nyitásoknak csak $\sim 20\%$ -a végződik ATP hidrolízissel. Végző esetben, a katalízis teljes megszüntetése esetén, lassú nem-hidrolitikus kapuzás tapasztalható (0% csatolás), amint azt a D1370N mutáns is példázza (19. E ábra; ez a mutáció ugyanakkor a katalitikus Mg^{2+} ion koordinációjának megzavarása révén az NBD dimer élettartamát is jelentősen rövidíti; (Hung és mtsai., 1998; Hopfner és mtsai., 2000)). Ezen közleményünket (Csanády és mtsai., 2010) méltató kommentár nagy jelentőségű felfedezésnek minősítette e munkát, amit a következő idézetek is szemléltetnek: "*Conventional equilibrium gating mechanisms also remain in contention... The present study nails the coffin closed on such mechanisms*", valamint "*these experiments beautifully illustrate how the awesome power of single-channel analysis can reveal fundamentals*" (Miller, 2010).

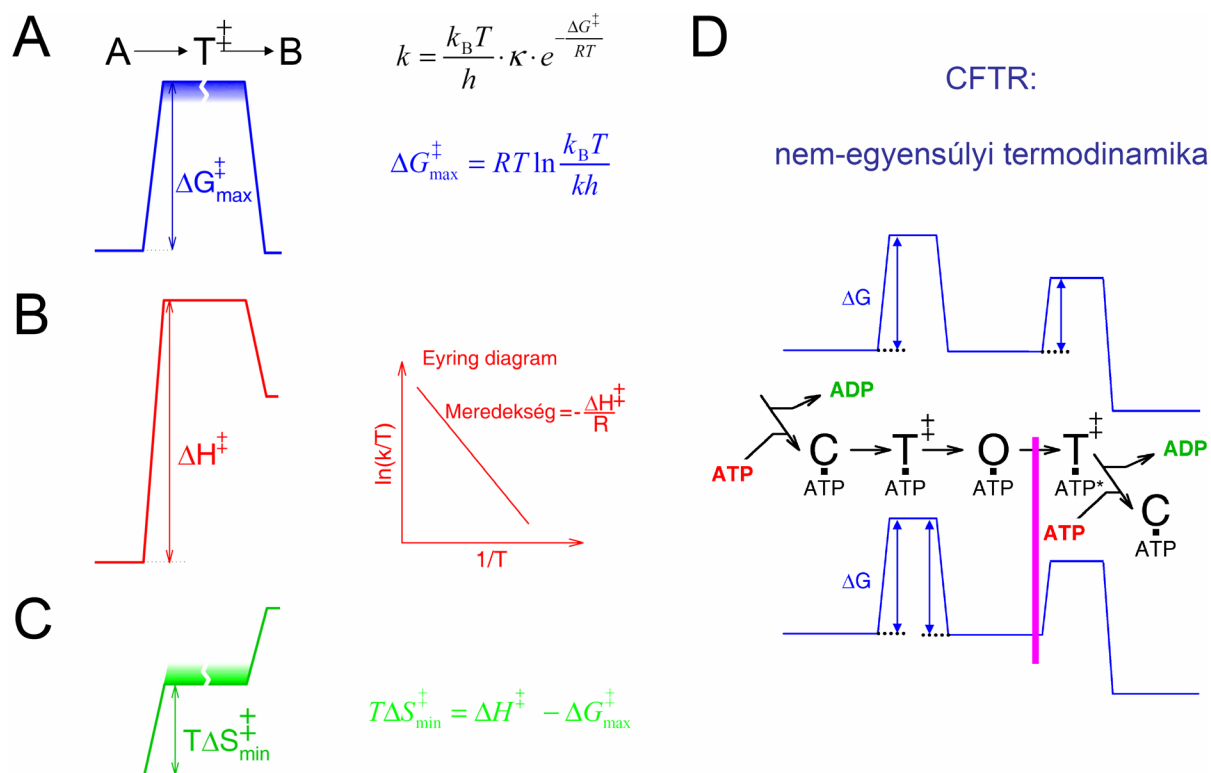
5.1.3.2. A CFTR kapuzási konformációváltozásainak termodinamikai jellemzése

A katalitikus ciklus pontosabb feltérképezése ellenére, továbbra is megválaszolatlan kérdés maradt, hogy milyen mechanizmussal idézi elő az NBD dimer kialakulása/szétesése a pórus kapuzási konformációváltozásait. Ennek mélyebb megértése céljából meg kívántuk vizsgálni az egyes kapuzási lépések termodinamikai paramétereit.

A kémiai reakciók sebessége egy energiagáton, a magas szabadentalpiájú aktivált állapoton (20. A ábra, $T^\ddagger$ állapot), való átjutás sebességét tükrözi. Az aktivált komplex elmélet értelmében a reakciósebesség (k) az Eyring-Polányi egyenlet (20. A ábra, *fekete egyenlet*) segítségével egy prefaktor és egy exponenciális tényező szorzataként számítható, mely utóbbi tartalmazza az aktivált állapot szabadentalpiáját ($\Delta G^\ddagger$). Bár a prefaktorban szereplő "átviteli együttható" ($0 \leq \kappa \leq 1$) pontos értéke általában nem ismert (Chakrapani és Auerbach, 2005), a reakciósebesség abszolút értékének ismeretében ($\kappa=1$ választással) legalábbis felső becslést adhatunk az aktivációs szabadentalpiára ($\Delta G_{\max}^\ddagger$; 20. A ábra, *kék egyenlet*). Ezzel szemben az aktivációs entalpia ($\Delta H^\ddagger$; 20. B ábra) a reakciósebesség hőmérsékletfüggéséből pontosan is meghatározható, a különböző hőmérsékleteken mért reakciósebességekből generált Eyring diagram (20. B ábra, *jobb*) meredekségeként (Fersht, 2002). A $\Delta G_{\max}^\ddagger$ és a $\Delta H^\ddagger$ különbségéből pedig az aktivációs entrópia alsó becslése ($\Delta S_{\min}^\ddagger$) is adódik (20. C ábra, *zöld egyenlet*).

A CFTR esetében mindemellett azt is szem előtt kell tartani, hogy a kapuzás nem-egyensúlyi ciklikus folyamat: a pórus egy nyitását majd csukódását követően a rendszer nem jut vissza kiindulási állapotába, hiszen eközben egy ATP molekula ADP-vé és foszfáttá alakult át (20. D ábra, *reakcióséma*). Vagyis, a csukódási lépés nem a nyitási lépés megfordítottja: e két lépés sebességei két külön energiagát egy-egy oldalát jellemzik (20. D ábra, *felső szabadentalpia diagram, kettős nyilak*). A nyitási lépés visszafordításának energetikáját (20. D ábra, *alsó szabadentalpia diagram, jobb oldali kettős nyíl*) csak úgy lehet vizsgálni, ha megakadályozzuk az ATP hidrolízist, amely alternatív utat kínál a csukódásra (20. D ábra, *rózsaszín függőleges vonal*).

E három kapuzási lépés (nyitás (19. B ábra, $C_1 \rightarrow O_1$ lépés), nem-hidrolitikus záródás (19. B ábra, $O_1 \rightarrow C_1$ lépés), hidrolitikus záródás (19. B ábra, $O_1 \rightarrow O_2 \rightarrow C_2$

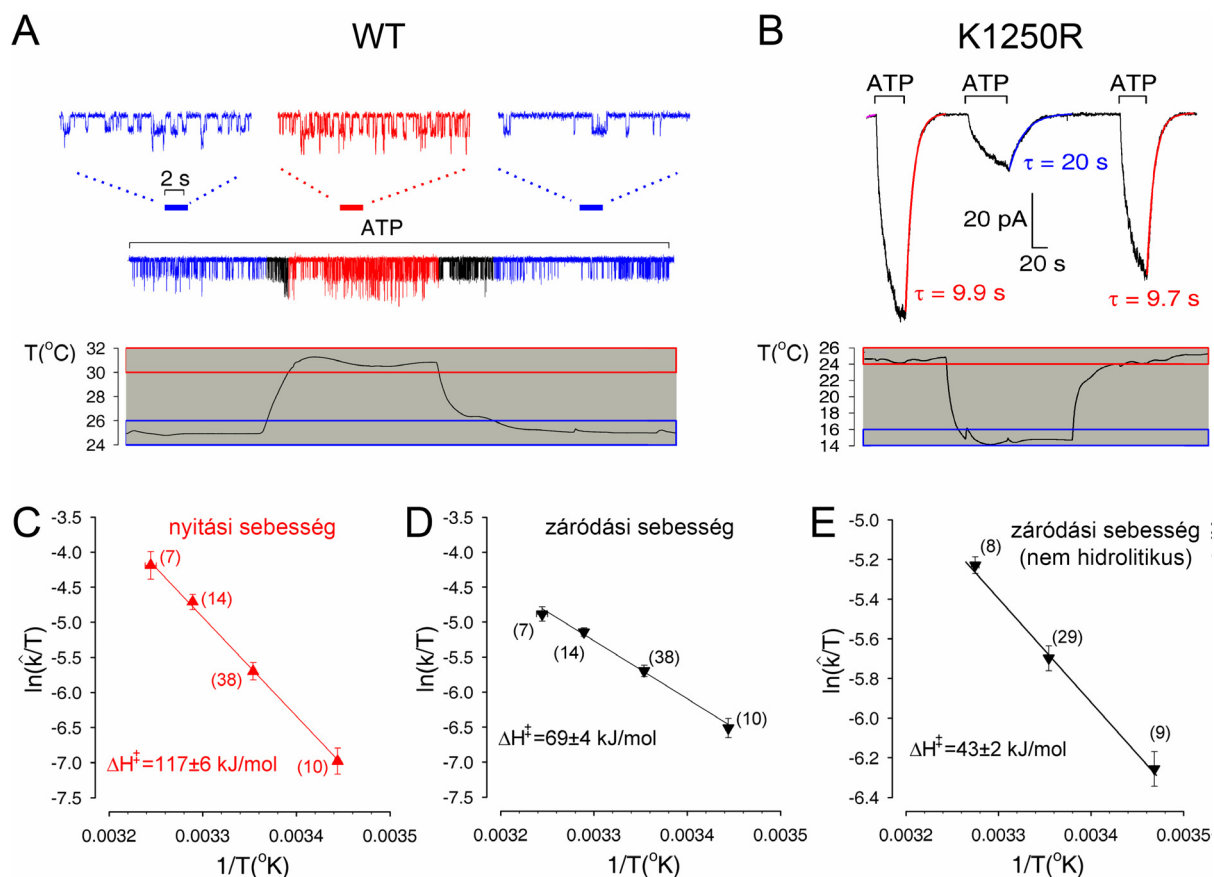


20. ábra. Aktivált komplex elmélet egyensúlyi és nem-egyensúlyi rendszerre.

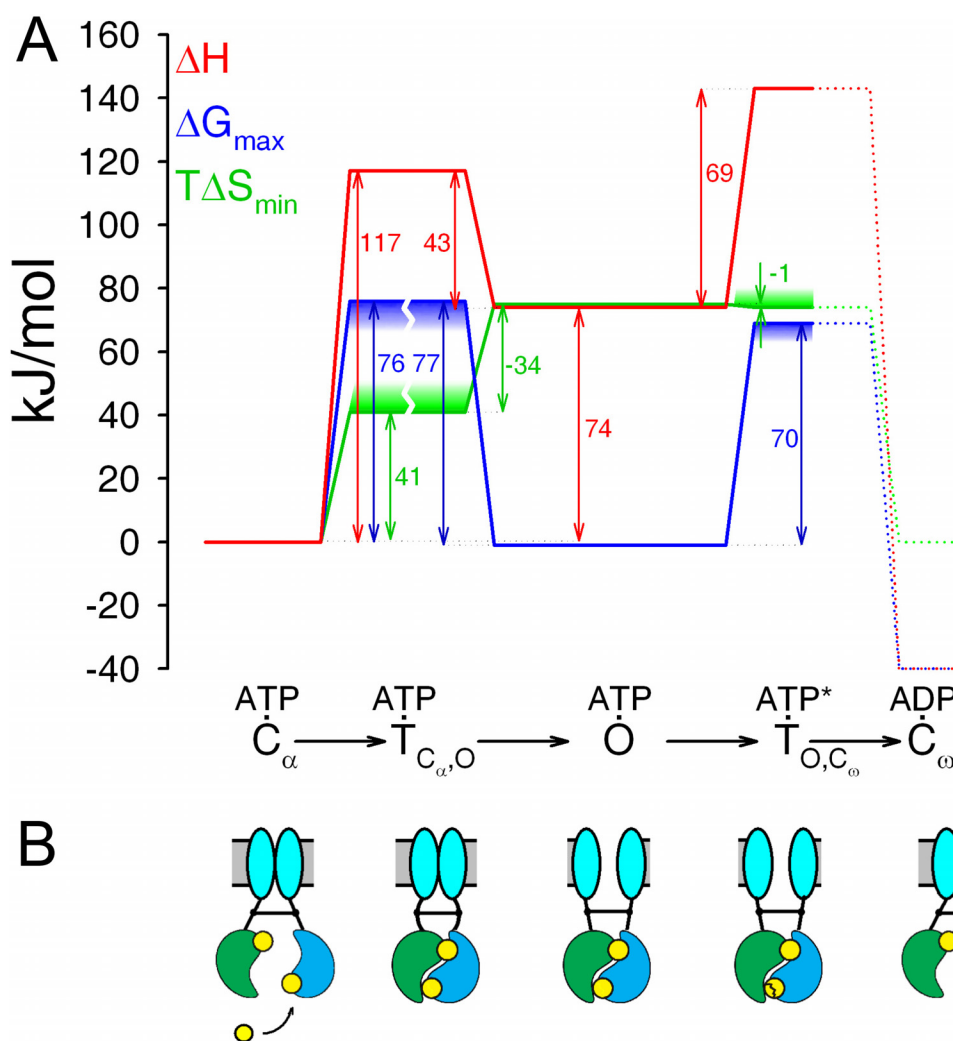
A-C, Kémiai reakció (**A**) szabadentalpia-, (**B**) entalpia-, illetve (**C**) entrópiaváltozása az aktivált állapotban való átjutás során. Az Eyring-Polányi egyenlet (**A**, *fekete egyenlet*) segítségével a reakciósebesség abszolút értékéből felső becslés adható az aktivációs szabadentalpiára (**A**, *kék egyenlet*), hőmérsékletfüggéséből pedig kiszámítható az aktivációs entalpia (**B**, Eyring diagram). E két becsült paraméter alsó becslést ad az aktivációs entrópiára (**C**, *zöld egyenlet*). **D**, A WT CFTR egyetlen pórusnyílását majd záródását jellemző állapotok, és e reakciósor szabadentalpia profilja (*fent*). A nyitási és záródási aktivációs szabadentalpiák (*függőleges kettős nyilak*) két külön energiagát egy-egy oldalát jellemzik. Az ATP hidrolízis megakadályozásával (*függőleges rózsaszín vonal*) egyensúlyi rendszer hozható létre (*alsó szabadentalpia profil*), ilyenkor a nyitási és záródási aktivációs szabadentalpiák (*függőleges kettős nyilak*) ugyanazon energiagát két oldalát írják le.

útvonal)) vizsgálata céljából egyrészt regisztráltuk egyedi vad típusú CFTR csatornák kapuzási kinetikáját (21. A ábra, *áram regisztrátum*) – azaz nyitási és csukódási sebességeit – telítési [ATP] mellett, különböző beállított hőmérsékleteken (15-35°C között), miközben párhuzamosan mértük az aktuális hőmérsékletet is a patch közvetlen közelében (21. A ábra, *hőmérséklet regisztrátum*), egy parányi termisztor segítségével. Másrészt, makroszkópos áramrelaxációk illesztésével meghatároztuk nem-hidrolitikus mutánsok (pl. az NBD2 konzervált, katalízis szempontjából kulcsfontosságú Walker A lizinének K1250R és K1250A mutánsai) lassú csukódási sebességeinek hőmérsékletfüggését is (21. B ábra). Ezen mutánsoknak a WT csatornáéhoz képest kb. 100-szor lassabb záródása az ATP-t kötött NBD dimer lassú szétesését tükrözi; ezzel modelleztük a WT csatornák nyitási lépésének visszafordítását (v.ö. 20. D ábra, *alsó szabadentalpia diagram*). A kapott Eyring diagramok (21. C-D-E ábrák) meredekségeiből meghatároztuk e három kapuzási lépés $\Delta H^\ddagger$ értékeit, majd összevetettük azokat e sebességek 25°C-on mért abszolút értéke alapján becsült (20. A ábra, *kék egyenlet*) $\Delta G^\ddagger_{\max}$ értékekkel: így $T\Delta S^\ddagger_{\min}$ is adódott. Ezen adatokból végül összeállíthattuk egy kapuzási ciklus energetikai profilját, azaz e három termodinamikai függvény alakulását a csatorna megnyílása, majd egy ATP elhasítását követő becsukódása során (22. A ábra).

A nyitási átmeneti állapot két szempontból is érdekesnek mutatkozott. Egyrészt, rendkívül nagy $\Delta H^\ddagger$ érték jellemzi (~120 kJ/mol; v.ö. 22. A ábra, *piros görbe*), másrészt a $\Delta H^\ddagger$ és $\Delta G^\ddagger_{\max}$ (~80 kJ/mol; v.ö. 22. A ábra, *kék görbe*) értékek közötti nagy különbség jelentős entrópiánövekedést sejtet ($T\Delta S^\ddagger_{\min}$ ~40 kJ/mol; v.ö. 22. A ábra, *zöld görbe*). Ez utóbbi konzisztens azzal a korábbi felvetéssel, miszerint a nyitási átmeneti állapotban az NBD dimer már kialakult (Vergani és mtsai., 2005): fehérje-fehérje dimer képződést gyakran kíséri entrópia növekedés, hiszen ilyenkor a kölcsönható felületeket borító rendezett hidrátburok kiszorul a rendezetlen folyadékfázisba. A molekuláris feszülésre utaló nagyon magas aktivációs entalpiát pedig úgy értelmezzük, hogy a nyitási aktivált állapotban az NBD dimer ugyan már kialakult, de a pórus még zárt (22. B ábra, 2. *állapotséma*): ez idézheti elő a tapasztalt molekuláris feszülést, amely azután a nyitott állapot irányában oldódik (22. B ábra, 3. *állapotséma*). Eredményeink alapján tehát a nyitási reakció tovaterjedő konformációs hullámmal írható le: a nyitási konformációváltozást az NBD dimer kialakulása indítja el, e folyamatban a két ATP molekuláris ragasztó szerepét tölti be.



21. ábra. A CFTR kapuzási lépéseinek hőmérsékletfüggése. **A**, Két db. előfoszforilált WT CFTR csatorna árama (*fent*) inside-out patch-ben, 2 mM ATP jelenlétében, -80 mV membránpotenciálon, miközben a lokális hőmérséklet (*lent*) 25 °C és 31°C között váltakozik. Az időben széthúzott szakaszokon jól látható a kapuzási kinetika gyorsulása a magasabb hőmérsékleten. **B**, Inside-out patch-ben, PKA elvonását követően, -80 mV membránpotenciálon, 2 mM ATP rövid alkalmazásával 25 °C és 15°C lokális hőmérsékleten (*lent*) ismételt aktivált makroszkópos K1250R CFTR áram (*fent*). Az ATP elvonását követő áramrelaxációk exponenciális függvényekkel lettek illesztve (*színes görbék*), az illesztett időállandók (τ) inverze a záródási sebesség. **C-E**, Egyedi WT CFTR csatornák steady-state nyitási (**C**) és záródási (**D**) sebességeiből, illetve (**E**) K1250R CFTR csatornák makroszkópos záródási sebességeiből előállított Eyring diagramok, illetve azok meredekségeiből számolt aktivációs entalpiák.



22. ábra. A WT CFTR kapuzásának energetikai profilja. **A**, (*Lent*) A WT CFTR egyetlen pórusnyílását majd záródását jellemző állapotok sor, és (*fent*) e reakció sor szabadentalpia (kék), entalpia (piros), illetve entrópia (zöld) profilja. A nyitási és záródási aktivációs energia értékek (*függőleges kettős nyilak melletti számok*) a WT CFTR csatornák steady-state nyitási illetve záródási sebességeinek mért paramétereiből, a nem-hidrolitikus záródásai a K1250R csatornák záródási sebességének paramétereiből lettek számolva. **B**, Az energetikai profil molekuláris értelmezése. A nyitási aktivált állapot entrópia-növekedését a már zárt NBD dimer érintkezési felületeiről a rendezetlen oldatba kiszoruló vízmolekulák, óriási aktivációs entalpiáját pedig a már kialakult NBD dimer de még zárt pórus érintkezési felületén kialakuló feszülés (*görbült rudak*) magyarázhatja. A záródási aktivált állapot a sebességmeghatározó lépés, azaz az ATP hidrolízis átmeneti állapotát tükrözi, az ATP β - γ kötésében jelentkező feszülés számottevő entrópiaváltozás nélkül okoz entalpia növekedést.

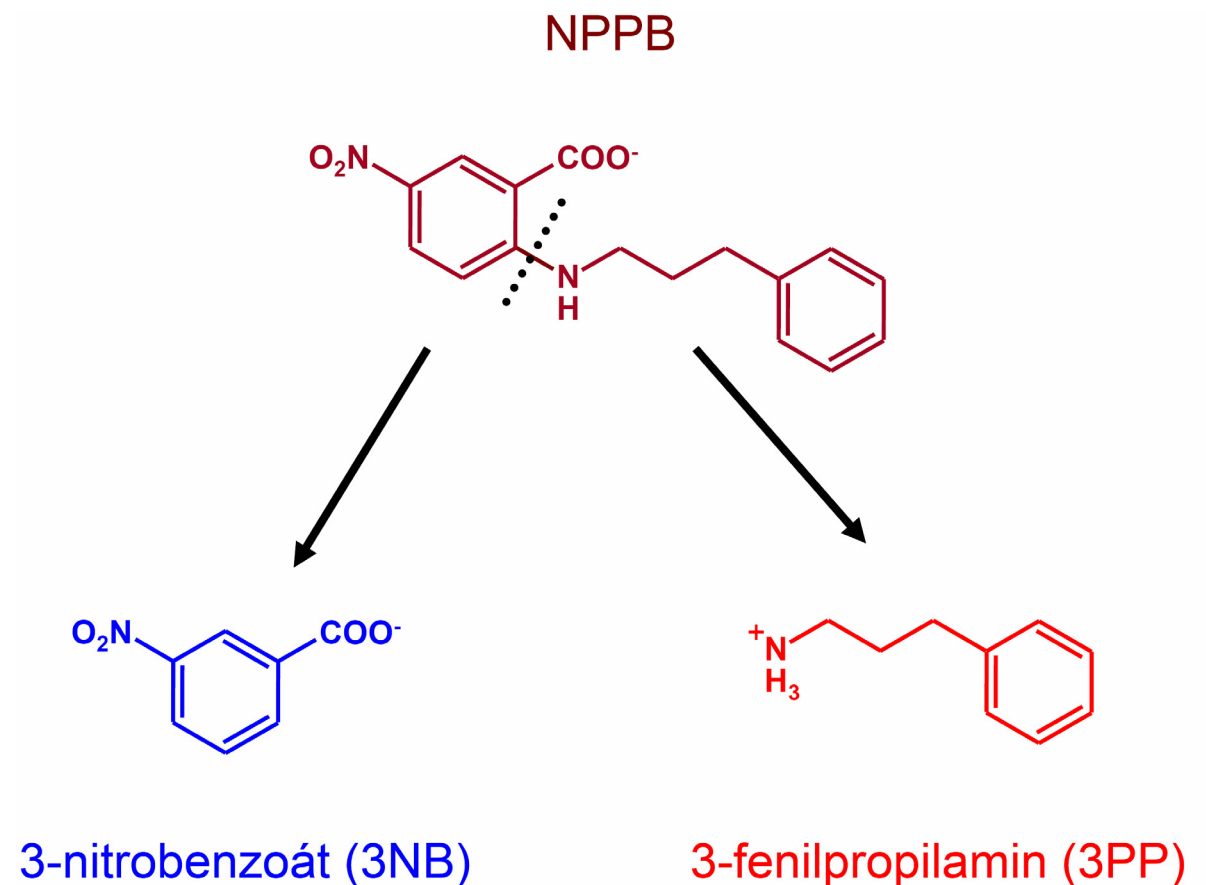
Az NBD dimer kialakulása feszülést idéz elő a még zárt állapotú TMD-ban, amely a pórus megnyílásakor – további entrópiaváltozás mellett – részlegesen oldódik.

Ezzel szemben a WT csatornák záródásakor a $\Delta H^\ddagger$ (~70 kJ/mol; 22. A ábra, *piros görbe, jobb oldali energiagát*) és $\Delta G_{\max}^\ddagger$ (~70 kJ/mol; 22. A ábra, *kék görbe, jobb oldali energiagát*) értékek hasonlóak, tehát a záródási aktivált állapot elérésekor nincs számottevő entrópiaváltozás (22. A ábra, *zöld görbe, jobb oldali energiagát*). Ez egybevág azzal az elképzeléssel, miszerint a záródás sebességhatározó lépése az ATP hidrolízis (19. B ábra, $O_1 \rightarrow O_2$ lépés): e lépés aktivációs entalpiája egyetlen kémiai kötésben – az ATP β - γ kötésében – jelentkező feszülést tükrözi. Miután az entrópia ebben az aktivált állapotban még nem csökken, azt gondoljuk, hogy az NBD dimer ekkor még intakt, és a pórus nyitva van (22. B ábra, 4. *állapotséma*; (Csanády és mtsai., 2006)).

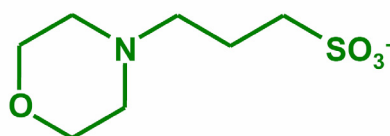
5.1.4. Egy CFTR stimulátor szerkezet-aktivitás vizsgálata

Az 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoát (NPPB; 23. ábra, *barna*) feszültségfüggő pórusblokkoló (24. ábra), amelyről emellett kiderült, hogy erőteljesen növeli a CFTR nyitvatartási valószínűségét (Wang és mtsai., 2005). A CFTR stimulátorok lehetséges terápiás jelentősége miatt makroszkópos és egyedi-csatornás mérések segítségével feltártuk az NPPB kapuzási hatásának mechanizmusát (Csanády és Torocsik, 2014a).

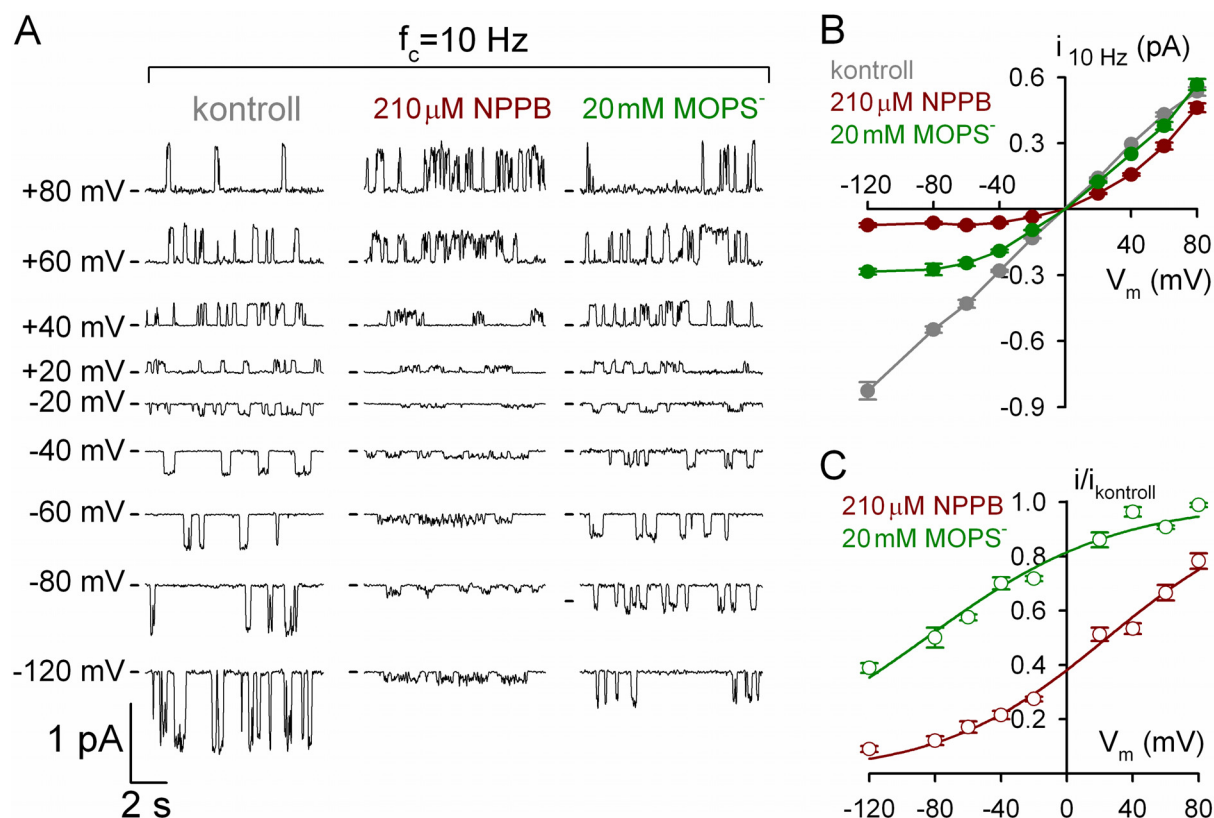
Erősen szűrt (10 Hz) egyedi csatornaáramokra (24. A ábra) gyakorolt (pórusblokkoló) hatását ($i_{\text{NPPB}}/i_{\text{kontroll}}$; 24. C és 25. A ábrák, *üres barna körök*) összevetve a steady-state makroszkópos WT CFTR áramokra gyakorolt hatásával ($I_{\text{NPPB}}/I_{\text{kontroll}}$; 25. A ábra, *telt barna körök*) számszerűsíthettük az NPPB nyitvatartási valószínűségre gyakorolt hatását ($P_{O; \text{NPPB}}/P_{O; \text{kontroll}} = (I_{\text{NPPB}}/I_{\text{kontroll}}) / (i_{\text{NPPB}}/i_{\text{kontroll}})$; 25. C ábra, *telt barna körök*). Megállapítottuk, hogy rögzített -120 mV membránpotenciál mellett bármely alkalmazott NPPB koncentráció lényegesen enyhébben csökkentette a WT csatornák steady-state makroszkópos áramát, mint amennyire az a pórusblokk alapján várható lett volna (25. A ábra, *függőleges sötétkék kettős nyíl*), ami alátámasztotta a nyitvatartási valószínűség stimulációját. Az alkalmazott maximális NPPB koncentráció (210 μM) mellett a WT CFTR csatornák nyitvatartási valószínűsége kb. 4-szeresére (25. C ábra, *barna körök*), a cisztikus fibrózisban



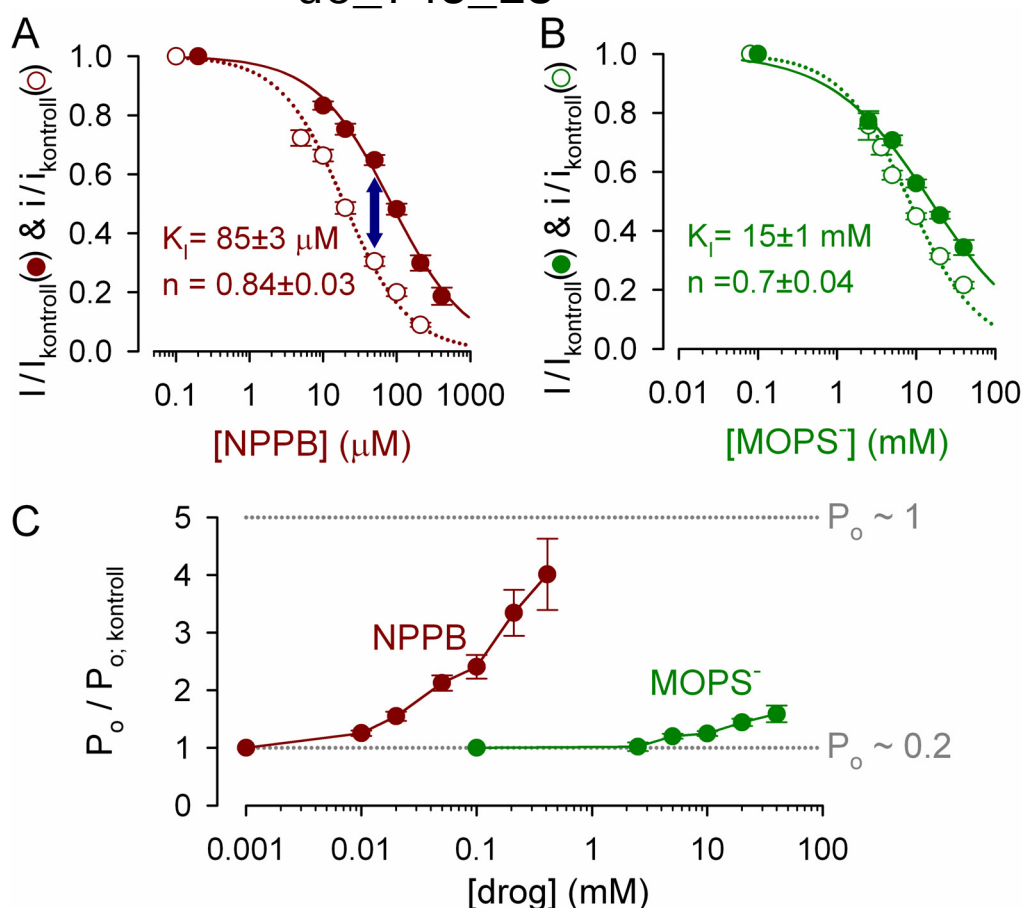
MOPS



23. ábra. CFTR pórusblokkoló drogok kémiai szerkezete. Az NPPB (*barna*) és a MOPS (*sötétzöld*), valamint az NPPB-t alkotó két részmolekula, a 3-nitrobenzoát (3NB, *kék*) és 3-fenilpropilamin (3PP, *piros*) szerkezeti képletei. Fiziológias pH-n az NPPB és a 3NB teljesen deprotonáltak (anionok), a 3PP teljesen protonált (kation), a MOPS-nak pedig 50%-a deprotonált (anion), 50%-a protonált (semleges).



24. ábra. Az NPPB és a MOPS pórusblokkoló hatásának feszültségfüggése. **A**, Erősen szűrt (sávszélesség 10 Hz) egyedi WT CFTR csatorna áramok 2 mM ATP jelenlétében -120 és +80 mV közötti különböző membránpotenciálokon, kontroll körülmények között (*bal*), illetve 210 μM NPPB (*közép*) illetve 20 mM MOPS $^-$ (*jobb*, [MOPS] $_{\text{teljes}}$ =40 mM) jelenlétében. **B**, Az egyedi csatorna amplitúdók feszültségfüggése kontroll körülmények között (szürke), illetve 210 μM NPPB (*barna*), vagy 20 mM MOPS $^-$ (*zöld*) jelenlétében. **C**, Relatív egyedi csatorna amplitúdók 210 μM NPPB (*barna*), vagy 20 mM MOPS $^-$ (*zöld*) jelenlétében. Az adott feszültségen a blokkoló jelenlétében mért amplitúdó az ugyanazon feszültségen mért kontroll amplitúdóhoz lett normálva. A folytonos görbék az $i/i_0(V_m) = (1 + \exp(-(RT/zF) \cdot (V_m - V_{1/2})))^{-1}$ Boltzmann függvény illesztését szemléltetik. Az illesztett paraméterek ($V_{1/2}$: középfeszültség; z : látszólagos töltés) a következők voltak: NPPB: $V_{1/2} = 24 \pm 2 \text{ mV}$, $z = 0.51 \pm 0.03$; MOPS: $V_{1/2} = 85 \pm 3 \text{ mV}$, $z = 0.45 \pm 0.03$.

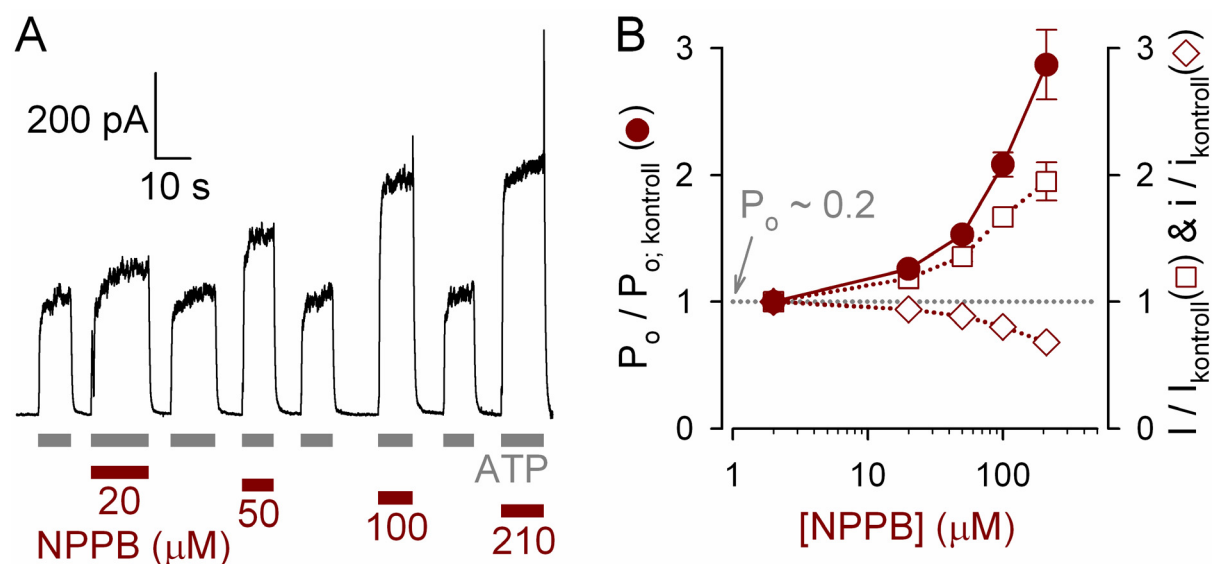


25. ábra. Az NPPB erőteljesen stimulálja a WT CFTR nyitvatartási valószínűségét. A-B, Telt körök: növekvő koncentrációban alkalmazott (A) NPPB illetve (B) MOPS⁻ fajlagos hatása a 2 mM ATP jelenlétében -120 mV membránpotenciálon mért steady-state makroszkópos WT CFTR áramokra. A drog jelenlétében mért áram a kontroll áramhoz lett normálva. A folytonos görbék a Hill egyenlet illesztését szemléltetik, az illesztett paraméterek az ábráról leolvashatók. *Üres körök:* növekvő koncentrációban alkalmazott (A) NPPB illetve (B) MOPS⁻ fajlagos hatása az egyedi csatorna amplitúdókra -120 mV membránpotenciálon; a pontozott görbék a Michaelis-Menten egyenlet illesztését szemléltetik. (NPPB: $K_i = 20 \pm 1 \mu M$, MOPS⁻: $8.3 \pm 0.3 mM$) Az A panelben a *sötétkék kettős nyíl* a két görbe közötti jelentős eltolódást hangsúlyozza. **C,** Növekvő koncentrációban alkalmazott NPPB (*barna körök*) illetve MOPS⁻ (*zöld körök*) fajlagos hatása a 2 mM ATP jelenlétében -120 mV membránpotenciálon kapuzó WT CFTR csatornák nyitvatartási valószínűségére. A nyitvatartási valószínűségre gyakorolt fajlagos hatás a makroszkópos áramokra és az egyedi csatorna amplitúdókra gyakorolt fajlagos hatások hányadosa. A kontroll körülmények között a WT CFTR nyitvatartási valószínűsége ~ 0.2 , a lehetséges maximális fajlagos stimuláció tehát 5-szörös (*szürke pontozott vonalak*).

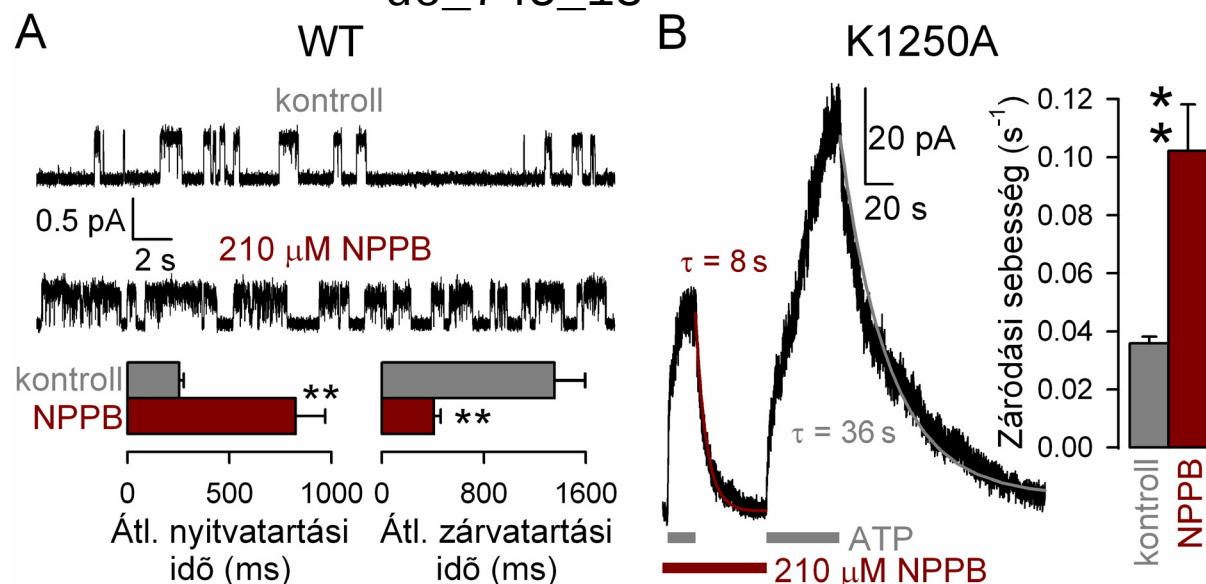
játszott szerepe miatt jelentős $\Delta F508$ CFTR csatornáké viszont kb. 20-szorosára nőtt. Ezzel szemben a kontrollként alkalmazott 3-(N-morfolino)propánszulfonát (MOPS; 23. ábra, *zöld*), egy másik ismert CFTR pórusblokkoló (24. ábra), nem hatott a kapuzásra (25. C ábra, *zöld körök*; v.ö. 25. B ábra). A pórusblokkal ellentétben az NPPB kapuzási hatásai szinte teljesen feszültségfüggetleneknek mutatkoztak (26. B ábra, *telt barna körök*), ezért a drog pozitív membránpotenciálokön összességében is stimulálta a makroszkópos WT (illetve $\Delta F508$) CFTR áramot (26. A ábra).

Az NPPB okozta P_o stimuláció molekuláris mechanizmusának megértése érdekében részletesen tanulmányoztuk az egyes kapuzási lépések sebességére gyakorolt hatásait. Megállapítottuk, hogy a drog az $O_1 \rightarrow O_2$ átmenet (v.ö. 6. ábra) szelektív lassítása révén 3-4-szeresére nyújtja a vad típusú csatornák átlagos nyitvatartási idejét (27. A ábra, *bal oldali oszlop diagram*); emellett kb. 3-szorosára növeli mind a vad-típusú csatornák nyitási sebességét ($C_1 \rightarrow O_1$ átmenet; 27. A ábra, *jobb oldali oszlop diagram*), mind a katalitikusan inaktív (K1250A, E1371S) mutánsok nem-hidrolitikus záródási sebességét ($O_1 \rightarrow C_1$ átmenet; 27. B ábra). Az NPPB tehát a $C_1 \leftrightarrow O_1$ lépésre katalizátorként hat: stabilizálja e konformációváltás átmeneti ("aktivált") állapotát, azaz csökkenti a C_1 és O_1 állapotok közötti energiagát magasságát. Ezt az energiagátat termodinamikai szempontból az 5.1.3.2. alfejezetben már jellemeztük (22. A ábra, *bal oldali energiagát*; 22. B ábra, 2. *állapotséma*): értelmezésünk szerint 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 valahol ebben a régióban található. Az NPPB kapuzási hatásainak feszültségfüggetlen volta (25. C és 26. B ábrák), továbbá az a tény, hogy e hatásokat nagy koncentrációjú MOPS jelenléte sem függesztette fel (28. ábra: a MOPS kiszorítja az NPPB-t a pórusból (28. A-B ábrák), de sem a hidrolitikus (28. C-D ábrák), sem a nem-hidrolitikus (28. E-F ábrák) záródási sebességre gyakorolt hatását nem befolyásolja), mindenesetre kétségkívül arra utalnak, hogy az NPPB "kapuzási kötőhelye" a póruson kívül keresendő (Csanády és Torocsik, 2014a).

A kapuzás stimulációjának ezen formája, amely kizárólag energiagátak befolyásolásán alapul, teljesen egyedi, és csak nem-egyensúlyi, ciklikus kapuzási mechanizmus esetén vezethet a nyitvatartási valószínűség növekedéséhez: egyensúlyi mechanizmus (29. A ábra, *bal*) esetén egy energiagát stabilizálása (29. B



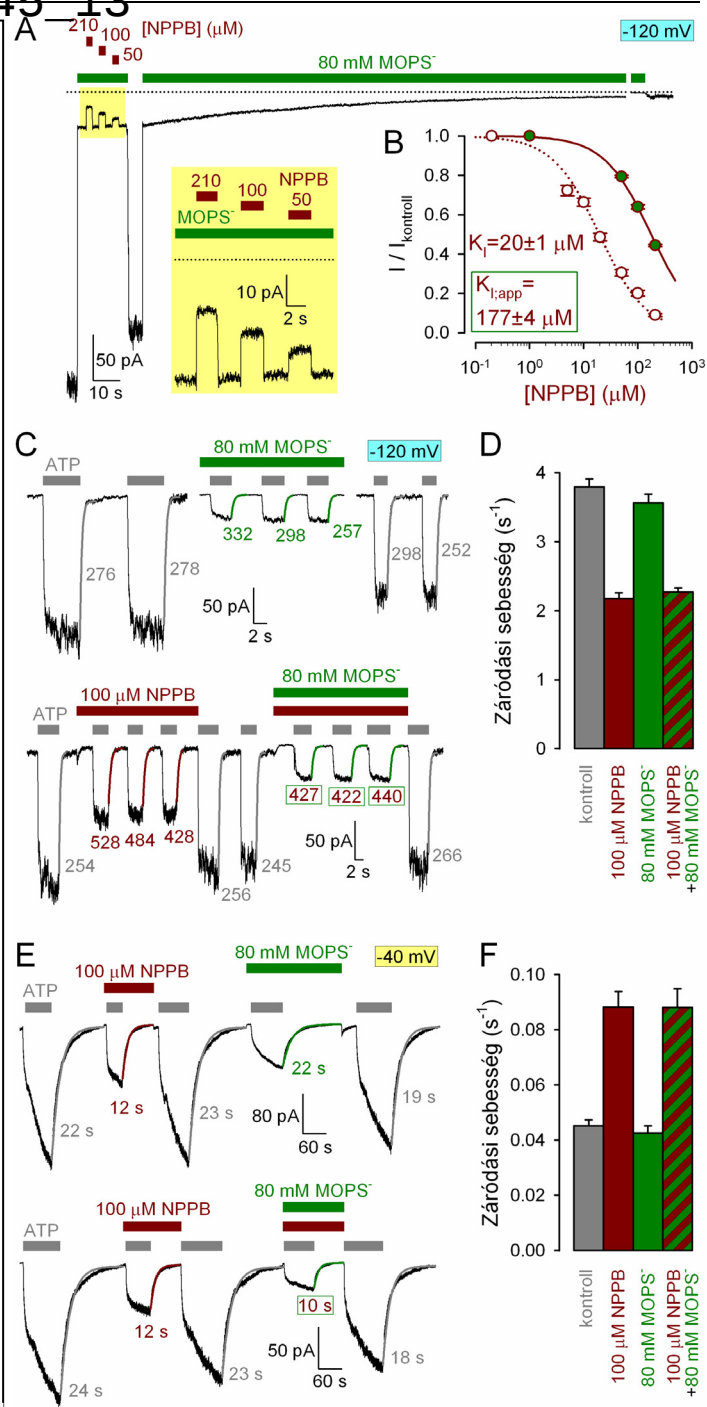
26. ábra. Az NPPB okozta CFTR stimuláció nagymértékben feszültségfüggetlen. **A**, Növekvő koncentrációjú NPPB hatása +60 mV membránpotenciálon, 2 mM ATP rövid alkalmazásával ismételt aktivált makroszkópos WT CFTR áram nagyságára. **B**, Növekvő koncentrációban alkalmazott NPPB fajlagos hatása a 2 mM ATP jelenlétében +60 mV membránpotenciálon kapuzó WT CFTR csatornák egyedi csatorna amplitúdójára (álló négyzetek), steady-state makroszkópos áramára (fekvő négyzetek, v.ö. A panel), illetve nyitvatartási valószínűségére (telt körök, v.ö. 25. C ábra). A nyitvatartási valószínűségre gyakorolt fajlagos hatás a makroszkópos áramokra és az egyedi csatorna amplitúdókra gyakorolt fajlagos hatások hányadosa.



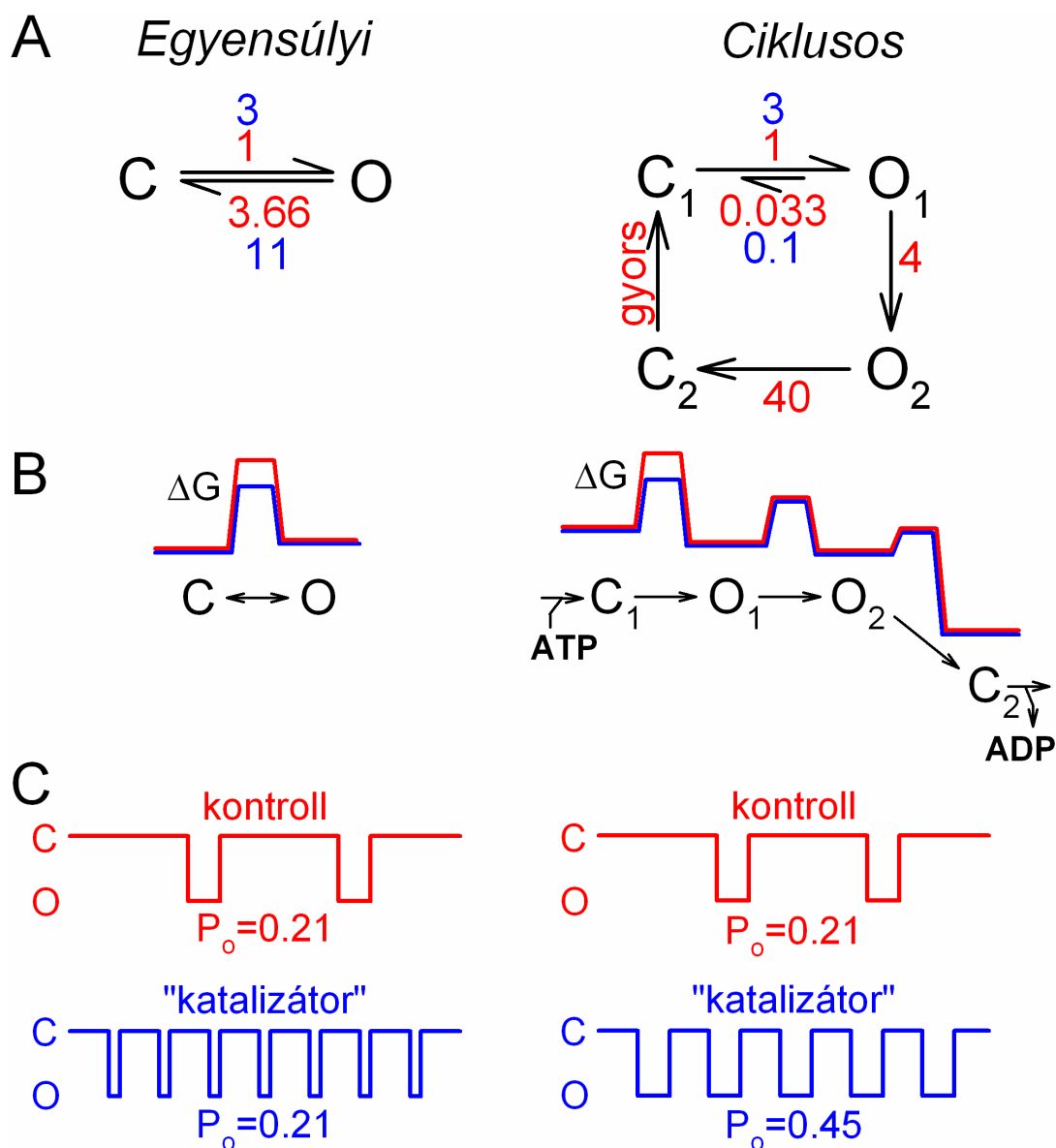
27. ábra. Az NPPB hatásai a CFTR kapuzásának egyes lépéseire. **A,** (Fent) Egyedi WT CFTR csatorna aktivitása 2 mM ATP jelenlétében, +60 mV membránpotenciálon kontroll körülmények között (*felső áramgörbe*) és 210 μ M NPPB jelenlétében (*alsó áramgörbe*). (Lent) Átlagos nyitvatartási és zárvatartási idők NPPB jelenlétében (*barna oszlopok*) illetve hiányában (*szürke oszlopok*). ** $P < 0.01$. **B,** (Bal) Inside-out patch-ben, PKA elvonását követően, +60 mV membránpotenciálon, 210 μ M NPPB jelenlétében majd hiányában, 10 mM ATP rövid alkalmazásával aktivált makroszkópos K1250A CFTR áram. Az ATP elvonását követő áramrelaxációk exponenciális függvényekkel lettek illesztve (*színes görbék*), az illesztett időállandók (τ) inverze a záródási sebesség. B, A K1250A CFTR csatornák makroszkópos záródási sebessége NPPB jelenlétében (*barna oszlop*) illetve hiányában (*szürke oszlop*). ** $P < 0.01$.

28. ábra. Az NPPB kapuzási kötőhelye a CFTR póruson kívül található. **A,** E1371S nem-hidrolitikus mutáns CFTR csatornák ATP elvonását követően lassan csillapodó makroszkópos árama -120 mV membránpotenciálon: a rövid időkre, különböző koncentrációkban alkalmazott pórusblokkolók (MOPS, *zöld sáv*, NPPB, *barna sávok*) fajlagos hatása a nyitvarekedt ($P_o \sim 1$) csatornák áramára (i/i_{kontroll}) tisztán az egyedi csatorna amplitúdókra gyakorolt fajlagos hatást (azaz a pórusblokkot, i/i_{kontroll}) tükrözi. *Sárga nagyított szakasz:* különböző NPPB koncentrációk alkalmazása 80 mM MOPS⁻ fenntartott jelenlétében. **B,** 80 mM MOPS⁻ jelenlétében alkalmazott NPPB egyedi csatorna amplitúdókra gyakorolt fajlagos hatásának dóziszfüggése (*zöld-barna körök*). A folytonos görbe a Michaelis-Menten egyenlet

28. ábra (folytatás)... illesztését szemlélteti, az illesztett látszólagos K_i érték az ábráról leolvasható (zöld keret). Az üres körök és a rájuk illesztett *pontozott vonal* (25. A ábráról átvezetve) az önmagában alkalmazott NPPB egyedi csatorna amplitúdókra gyakorolt fajlagos hatását szemléltetik. 80 mM MOPS⁻ (a MOPS⁻ K_i értéke 8.3 mM, v.ö. 25. B ábra, *üres körök és pontozott vonal*) jelenléte 9-szeresére növeli az NPPB látszólagos K_i értékét. **C**, Önmagában, vagy 100 μ M NPPB (*lent*), 80 mM MOPS⁻ (*fent*), illetve 100 μ M NPPB + 80 mM MOPS⁻ (*lent*) jelenlétében, rövid ideig alkalmazott 2 mM ATP által ismételt aktivált makroszkópos WT CFTR áramok -120 mV membránpotenciálon. Az ATP elvonását követő áramrelaxációk exponenciális függvényekkel lettek



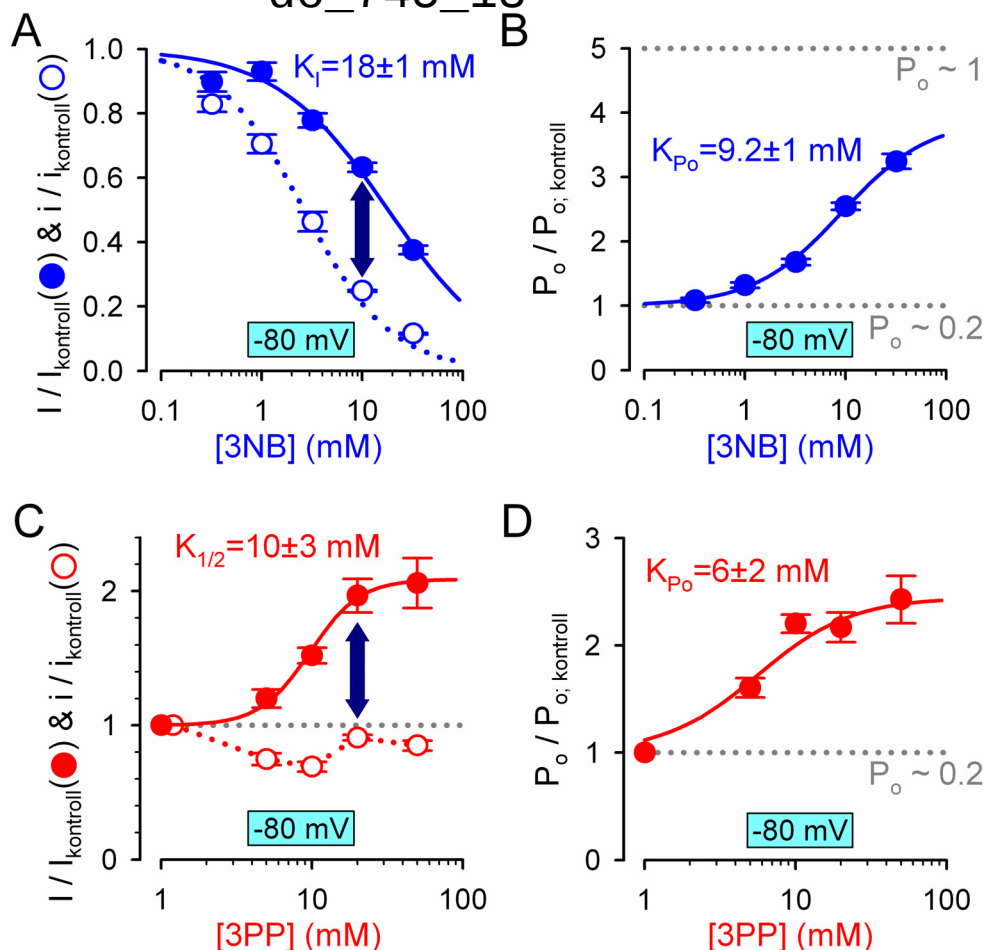
illetve (színes görbék), az időállandó (színes számok) inverze a záródási sebesség. **E**, Önmagában, vagy 100 μ M NPPB (*fent és lent*), 80 mM MOPS⁻ (*fent*), illetve 100 μ M NPPB + 80 mM MOPS⁻ (*lent*) jelenlétében, alkalmazott 10 mM ATP által ismételt aktivált makroszkópos K1250A CFTR áramok -40 mV membránpotenciálon. Színes görbék, illesztett exponenciálisok; színes számok, időállandók. **D, F**, (**D**) WT és (**F**) K1250A CFTR csatornák makroszkópos záródási sebességei kontroll körülmények között (szürke oszlop), 100 μ M NPPB (barna oszlop), 80 mM MOPS⁻ (zöld oszlop), illetve 100 μ M NPPB + 80 mM MOPS⁻ (csíkozott oszlop) jelenlétében.



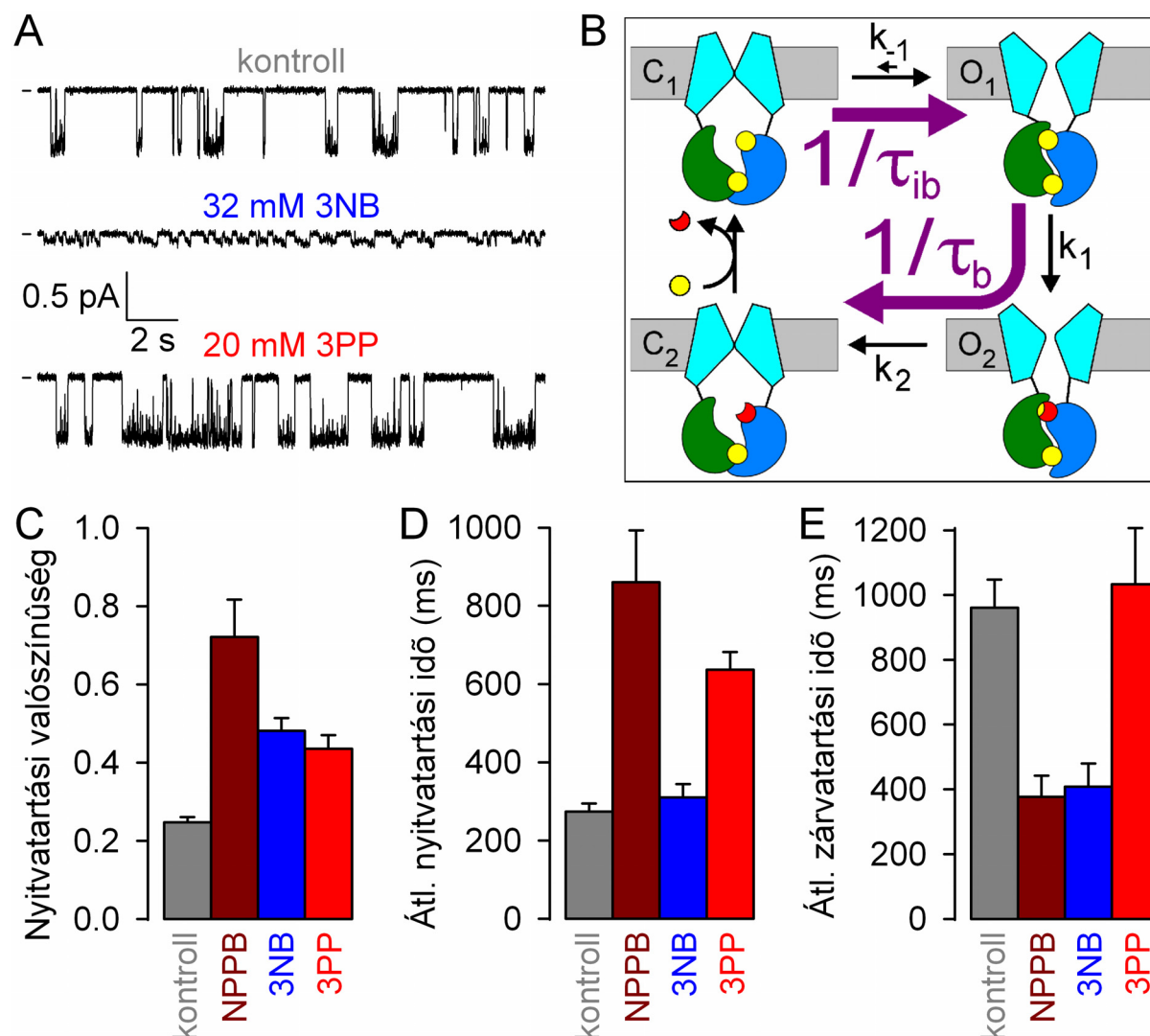
29. ábra. Katalizátor hatás csak nem-egyensúlyi mechanizmus esetén növelheti a nyitvatartási valószínűséget. **A**, Egyensúlyi (**A**) és a WT CFTR-re jellemző ciklusos nem-egyensúlyi (**B**) kapuzási séma. A feltüntetett sebességi állandók (piros számok) mellett a két modell azonos nyitási és záródási sebességeket jósol; a **B** panel sebességi állandói a CFTR-re jellemző értékek. A kék sebességi állandók a $C \leftrightarrow O$ ($C_1 \leftrightarrow O_1$) átmenetet gyorsító "katalizátor" jelenlétében várt értékek. **B**, Az **A** panelben ábrázolt kapuzási sémák szabadentalpia diagramjai kontroll körülmények között (piros) és a "katalizátor" jelenlétében (kék). A diagramok nem méretarányosak. **C**, A "katalizátor" hatása a kapuzási kinetikára egyensúlyi (bal) illetve nem-egyensúlyi ciklusos (jobb) kapuzási séma esetén.

ábra, *bal*) a nyitást és a záródást egyforma mértékben gyorsítja (29. A ábra, *bal, kék sebességi állandók*), a nyitvatartási valószínűséget azonban nem befolyásolja (29. C ábra, *bal*): ennek megfelelően az NPPB a katalitikusan inaktív K1250A mutáns egyensúlyi mechanizmussal zajló lassú kapuzásának csak kinetikáját gyorsította, nyitvatartási valószínűségét azonban nem befolyásolta (Csanády és Torocsik, 2014a). Ezzel szemben, ciklikus kapuzási mechanizmusának (29. A ábra, *jobb*) köszönhetően, a WT CFTR pórus záródásának az $O_1 \rightarrow C_1$ lépés nem sebességmeghatározó lépése, így a $C_1 \leftrightarrow O_1$ átmenet energiagátjának csökkentése (29. B ábra, *jobb*) szelektíven növeli a nyitási sebességet a záródási sebesség számottevő befolyásolása nélkül (29. A ábra, *jobb, kék sebességi állandók*), növelve ezzel a nyitvatartási valószínűséget (29. C ábra, *jobb*). Ráadásul, az $O_1 \rightarrow O_2$ lépés lassítása a fenti hatástól független, további stimulációt okoz. A WT (és $\Delta F508$) CFTR nyitvatartási valószínűségének növelésére jelenleg ez a létező legeredményesebb stratégia, amely az NPPB aktiváló kötőhelyének azonosítása esetén új célpontot jelenthetne a CFTR-t aktiváló gyógyszerek tervezésében (Csanády és Torocsik, 2014a).

Az NPPB szerkezet-hatás összefüggéseinek jobb megértése érdekében megvizsgáltuk, hogy e drog két, kinetikailag elkülöníthető kapuzási hatásáért a komplex molekula különböző részei felelősek-e. E célból "kettévágtuk" az NPPB molekulát egy 3-nitrobenzoát (3NB, "feji vég"; 23. ábra, *kék*) és egy 3-fenilpropilamin (3PP, "farki vég"; 23. ábra, *piros*) 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 (30. A ábra, *kék nyitott körök és pontozott vonal*), míg a 3PP kevésbé befolyásolta a csatornapórus vezetőképességét (30. C ábra, *piros nyitott körök és pontozott vonal*; a kismértékű blokkot a 3PP titrálására használt szulfát ionok okozták). Meglepetésre azonban, a makroszkópos áramokra gyakorolt hatásukat (30. A és C ábrák, *zárt körök*) a permeációra gyakorolt hatásukkal (30. A és C ábrák, *nyitott körök*) összevetve kiderült, hogy mind a 3NB, mind a 3PP erőteljesen stimulálja a CFTR nyitvatartási valószínűségét (30. B és D ábrák). Továbbá, az NPPB-hez képest csökkent affinitásuk alapján megállapítható, hogy mindkét részmolekula hasonló mértékben járul hozzá a teljes NPPB molekula kötési energiájához (a látszólagos K_d értékekből számolt kötési szabadentalpiák: $\Delta G_{NPPB}^0 =$

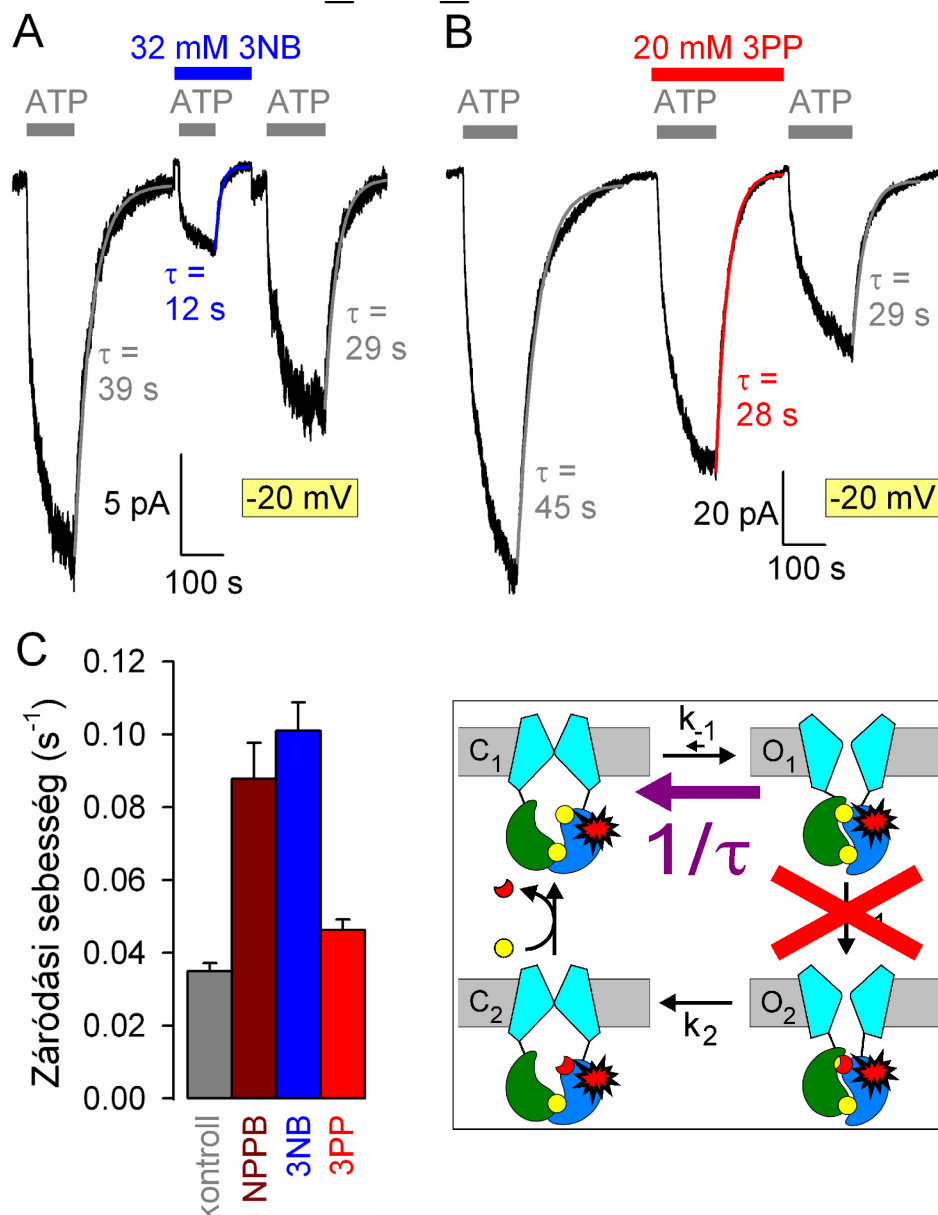


30. ábra. Mind a 3NB, mind a 3PP növeli a WT CFTR csatornák nyitvatartási valószínűségét. **A, C,** Telt körök: növekvő koncentrációban alkalmazott (A) 3NB illetve (C) 3PP-szulfát fajlagos hatása a 2 mM ATP jelenlétében -80 mV membránpotenciálon mért steady-state makroszkópos WT CFTR áramokra. A drog jelenlétében mért áram a kontroll áramhoz lett normalva. A folytonos görbék a Hill egyenlet illesztését szemléltetik, a látszólagos affinitások az ábrákról leolvashatók. Üres körök: növekvő koncentrációban alkalmazott (A) 3NB illetve (C) 3PP-szulfát fajlagos hatásai az egyedi csatorna amplitúdókra -80 mV membránpotenciálon; az A panelben a *pontozott görbe* a Michaelis-Menten egyenlet illesztése ($K_i = 2.6 \pm 0.2 \text{ mM}$), a C panelben látható mérsékelt blokkot a szulfát ionok okozzák. A sötétkék kettős nyílak a két ábrázolt görbe közötti jelentős eltolódást hangsúlyozzák. **B, D,** Növekvő koncentrációban alkalmazott 3NB (B) illetve 3PP (D) fajlagos hatása a 2 mM ATP jelenlétében -80 mV membránpotenciálon kapuzó WT CFTR csatornák nyitvatartási valószínűségére. A nyitvatartási valószínűségre gyakorolt fajlagos hatás a makroszkópos áramokra és az egyedi csatorna amplitúdókra gyakorolt fajlagos hatások hányadosa. Kontroll körülmények között a WT CFTR nyitvatartási valószínűsége ~ 0.2 , a lehetséges maximális fajlagos stimuláció tehát 5-szörös (szürke pontozott vonalak).

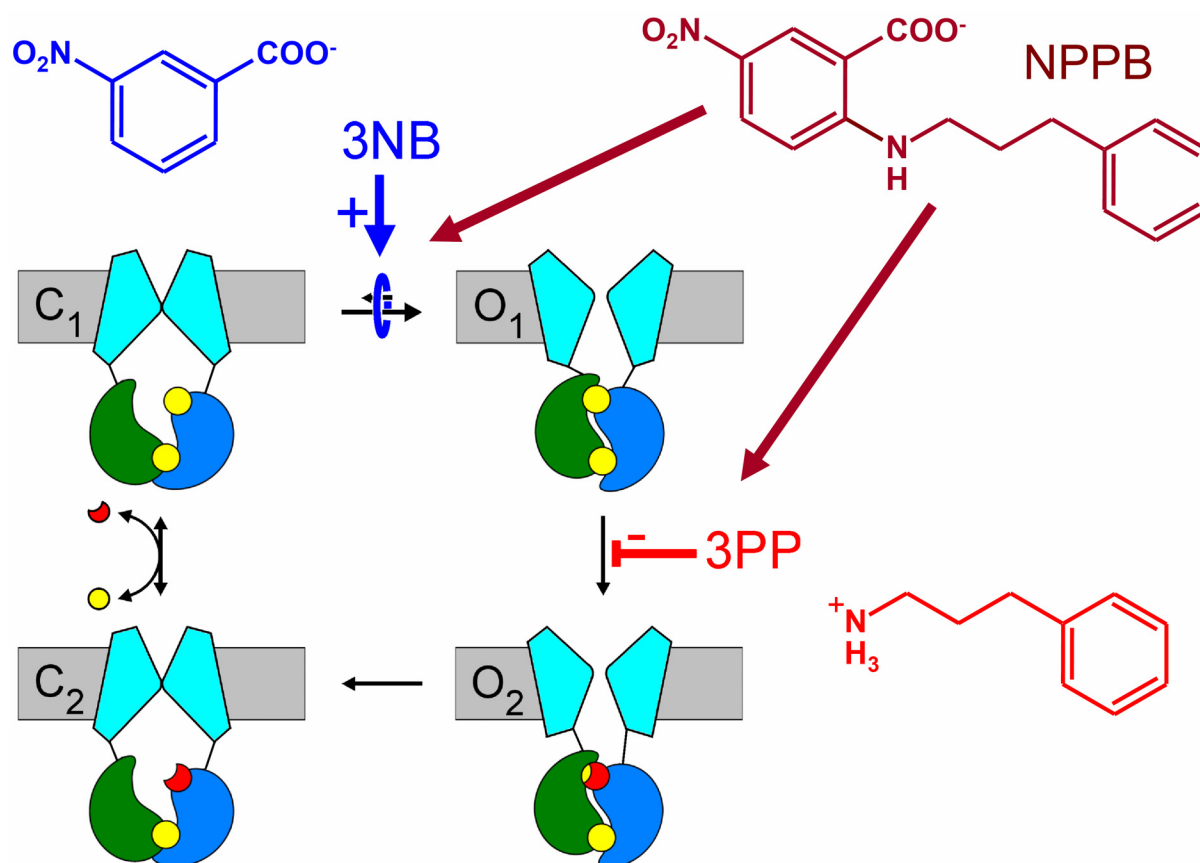


31. ábra. A WT CFTR csatornáknak a 3NB a nyitási sebességét növeli, a 3PP pedig a záródási sebességét csökkenti. **A**, Egyedi WT CFTR csatorna aktivitása 2 mM ATP jelenlétében, -80 mV membránpotenciálon kontroll körülmények között (felső áramgörbe), illetve 32 mM 3NB (középső áramgörbe) vagy 20 mM 3PP (alsó áramgörbe) jelenlétében. **B**, WT CFTR kapuzási séma a vizsgált kapuzási lépések szemléltetésére (lila nyilak). A telítési ATP mellett mért átlagos zárvatartási idő (τ_{ib}) inverze a $C_1 \rightarrow O_1$ átmenet sebességét, az átlagos nyitvatartási idő (τ_b) inverze az $O_1 \rightarrow O_2 \rightarrow C_2$ záródási reakcióút eredő sebességét tükrözi, utóbbiban az $O_1 \rightarrow O_2$ a sebességmeghatározó lépés. **C-E**, (**C**) Nyitvatartási valószínűség, (**D**) átlagos nyitvatartási és (**E**) zárvatartási idők kontroll körülmények között (szürke oszlopok), illetve 210 μ M NPPB (barna oszlopok), 32 mM 3NB (kék oszlopok), vagy 20 mM 3PP (piros oszlopok), jelenlétében.

-9.4 kT; $\Delta G^{\circ}_{3NB} = -4.7$ kT; $\Delta G^{\circ}_{3PP} = -5.1$ kT). Részletes kinetikai analízis alapján a 3NB kb. 3-szorosára növeli mind a WT CFTR csatornák nyitási sebességét (31. A ábra, *közép*, 31. E ábra, *kék*; a nyitási sebesség az átlagos zárvatartási idő (τ_{ib}) inverze, 31. B ábra), mind a nem-hidrolitikus K1250A mutáns zárósági sebességét (32. A ábra, 32. C ábra, *kék*; a záródási sebesség a makroszkópos záródási időállandó (τ) inverze), viszont nem hat a WT csatornák nyitvatartási idejére (31. D ábra, *kék*). Ezzel szemben a 3PP szelektíven ez utóbbi paramétert nyújtja meg (31. A ábra, 31. D ábra, *piros*; v.ö. 31. E és 32. C ábrák, *piros*). A 3NB és a 3PP részmozgások aktiváló hatásai tehát mikroszkópikus szinten eltérően valósulnak meg (33. ábra): a 3NB kizárólag a nyitási konformációváltozás ($C_1 \leftrightarrow O_1$ lépés) átmeneti állapotát stabilizálja, míg a 3PP szelektíven az ATP hidrolízist ($O_1 \rightarrow O_2$ lépés) gátolja (Csanády és Torocsik, 2014b). Az NPPB, amely szerkezetében egyesíti a 3NB és 3PP molekulákat, mindkét hatást képes előidézni. Fontos megjegyezni, hogy olyan csatornák esetén amelyek nyitvatartási valószínűsége önmagában alacsony, mint amilyen a $\Delta F508$ csatorna, az NPPB-nek ezen két kapuzási hatása egymástól függetlenül növeli a nyitvatartási valószínűséget. Ezért az NPPB szerkezet alapján tervezett nagy hatáserősségű potenciátor molekuláknak mindkét kapuzási hatást meg kellene őrizniük a pórusblokk kiiktatása mellett.



32. ábra. A 3NB növeli a nem-hidrolitikus záródás sebességét. **A, B,** Önmagában, vagy **(A)** 32 mM 3NB, illetve **(B)** 20 mM 3PP jelenlétében, rövid ideig alkalmazott 10 mM ATP által ismételt makroszkópos K1250A CFTR áramok -20 mV membránpotenciálon. Az ATP elvonását követő áramrelaxációk exponenciális függvényekkel lettek illesztve (színes görbék), az illesztett időállandó (τ) inverze a záródási sebesség. **C, (Bal)** A K1250A CFTR csatornák makroszkópos záródási sebessége kontroll körülmények között (szürke oszlop), 210 μ M NPPB (barna oszlop), 32 mM 3NB (kék oszlop), illetve 20 mM 3PP (piros oszlop) jelenlétében. **(Jobb)** Kapuzási séma a vizsgált kapuzási lépés szemléltetésére (lila nyíl). A K1250A mutáció (piros csillag) kiiktatja az ATP hidrolízist (piros X). Ilyen körülmények között a lassú záródási sebesség ($1/\tau$) az $O_1 \rightarrow C_1$ átmenet sebességét tükrözi.



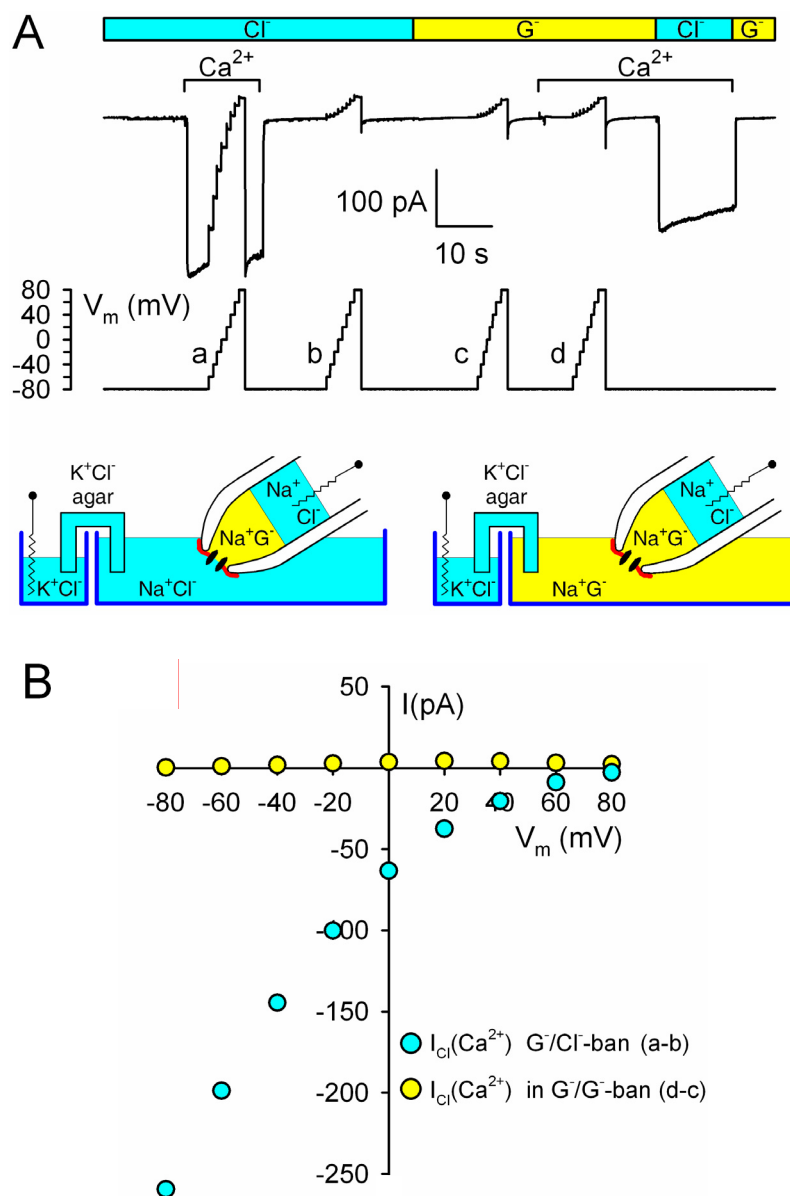
33. ábra. A 3NB és a 3PP kiváltotta kapuzási hatások mechanizmusának összefoglalása. Az NPPB "feji vége", a 3NB (kék), a C₁↔O₁ átmenetet katalizálja (kék nyíl). Az NPPB "farki vége", a 3PP (piros), az O₁→O₂ átmenetet lassítja (piros nyíl). Az NPPB (barna) önmagában mindkét hatást előidézi (barna nyilak).

5.2. A TRPM2 szerkezete, működése

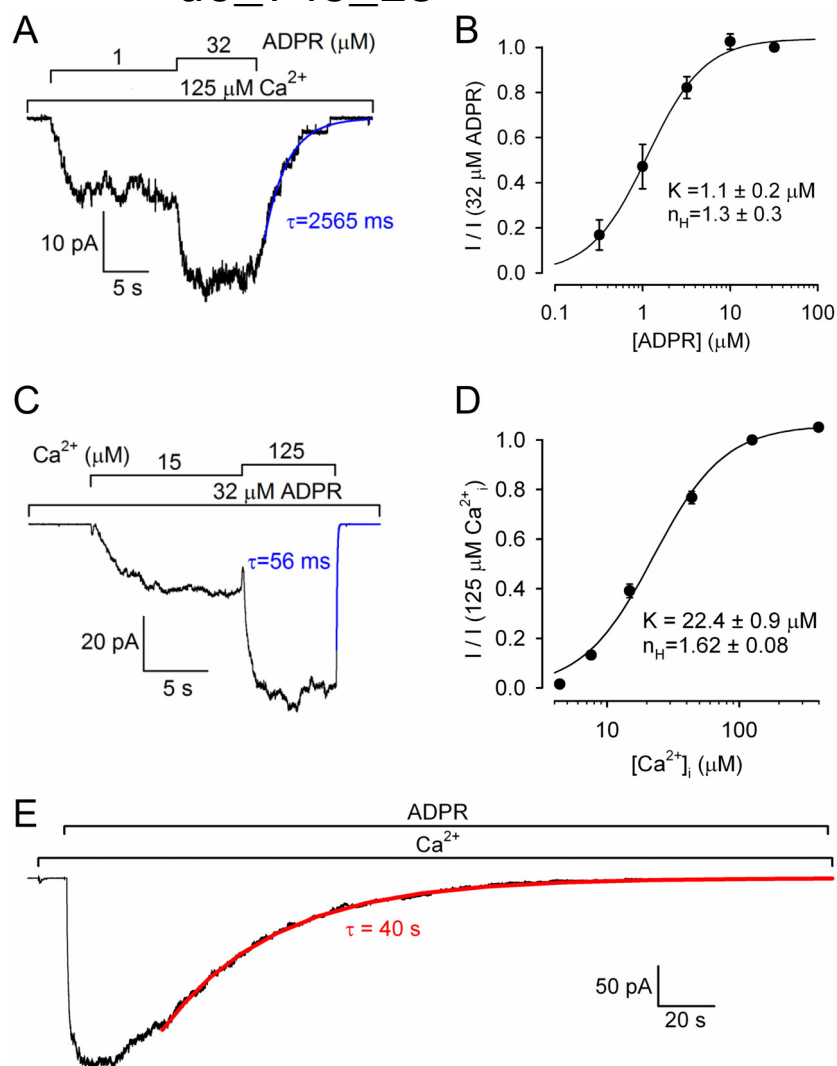
5.2.1. A TRPM2 biofizikai vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer létrehozása

A humán TRPM2 csatorna biofizikai vizsgálatára a CFTR csatornák estén már bevált *Xenopus laevis* oocyta heterológ expressziós rendszert választottuk. A TRPM2 békapetesejtkben, inside-out patch-ben, történő vizsgálatához azonban ki kellett iktatnunk e sejtek Cl^- ionok jelenlétében megfigyelhető markáns endogén Ca^{2+} aktivált Cl^- áramát (34. A ábra; 34. B ábra, *világoskék körök*). Megmutattuk, hogy szimmetrikus 140 mM-os Na-glukonát oldatban az intracelluláris Ca^{2+} nem indukál endogén áramot (34. A ábra; 34. B ábra, *sárga körök*), így ebben az ion környezetben a TRPM2 áram szelektíven vizsgálható. Mivel a TRPM2-t intracelluláris Ca^{2+} aktiválja, elengedhetetlen volt számunkra az alkalmazott Ca^{2+} koncentrációk pontos ismerete. E célból fluoreszcens titrálós módszerrel meghatároztuk a glukonát Ca^{2+} affinitását ($K_d \sim 20$ mM), így kiszámíthattuk glukonát alapú kád oldataink szabad Ca^{2+} koncentrációját ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{szabad}} \approx (1/8) \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{teljes}}$). Újonnan beállított inside-out patch-clamp kísérleti rendszerünk lehetővé tette a membránpotenciál és a csatornák intracelluláris felszínét érő ligand koncentrációk közvetlen, gyors kontrollját. Így elsőként nyílt lehetőségünk arra, hogy különböző membránpotenciálokön vizsgálni tudjuk egyrészt az agonista koncentrációk hirtelen megváltoztatására kapott makroszkópos áramrelaxációk kinetikáját, másrészt az egyedi csatornák steady-state kapuzását is (Csanády és Torocsik, 2009).

Inside-out patch-clamp mérések segítségével meghatároztuk a TRPM2 csatornák kapuzásának alapvető biofizikai tulajdonságait. Először is megállapítottuk, hogy az ADPR mellett az intracelluláris Ca^{2+} obligát ko-aktivátor: a TRPM2 csatornák csak mindkét intracelluláris ligand együttes jelenlétében kapuznak (35. A és C ábrák). A két ligand egyikének vagy másikának elvonását követő záródási relaxációk sebessége azonban két nagyságrenddel eltér egymástól: ADPR elvonását követően a csatornák lassabban (időállandó ~ 2 s; 35. A ábra, *kék görbe*), Ca^{2+} elvonását követően gyorsabban (időállandó ~ 50 ms; 35. C ábra, *kék görbe*) záródnak. Ez arra utal, hogy nyitott csatornáknban a kötött ADPR nem szabadon hozzáférhető az oldat számára (teljes vagy részleges okklúzió), míg a Ca^{2+} ionok nyitott állapotban is érintkeznek az oldattal. Telítési $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében az ADPR látszólagos affinitása $K_{1/2} \sim 1$ μM (35. A, B ábrák), telítési $[\text{ADPR}]$ jelenlétében pedig a Ca^{2+} látszólagos



34. ábra. Szimmetrikus Na-glukonát oldatban az endogén Ca^{2+} -aktivált Cl^- áram eltűnik. **A**, Nem injektált *Xenopus laevis* petesejtből kiszakított inside-out patch párhuzamos áram (felső görbe) és membránpotenciál (alsó görbe) regisztrátuma a lent ábrázolt konfigurációban: Na-glukonát tartalmú pipetta oldat (sárga) jelenlétében, a kádoldat anionjának (glukonát, sárga, klorid, világoskék) ismételt váltogatása közben (ld. színes sáv, fent). Intracellulárisan alkalmazott $125\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} csak klorid alapú kádoldat jelenlétében idéz elő befelé irányuló makroszkópos áramot. **B**, A Ca^{2+} -indukált áram feszültségfüggése glukonát/klorid (világoskék körök), illetve glukonát/glukonát (sárga körök) ionkörnyezetben. Minden ábrázolt érték az A panelben az adott feszültségen Ca^{2+} jelenlétében mért áram és az ugyanazon feszültségen Ca^{2+} hiányában mért kontroll áram különbsége.



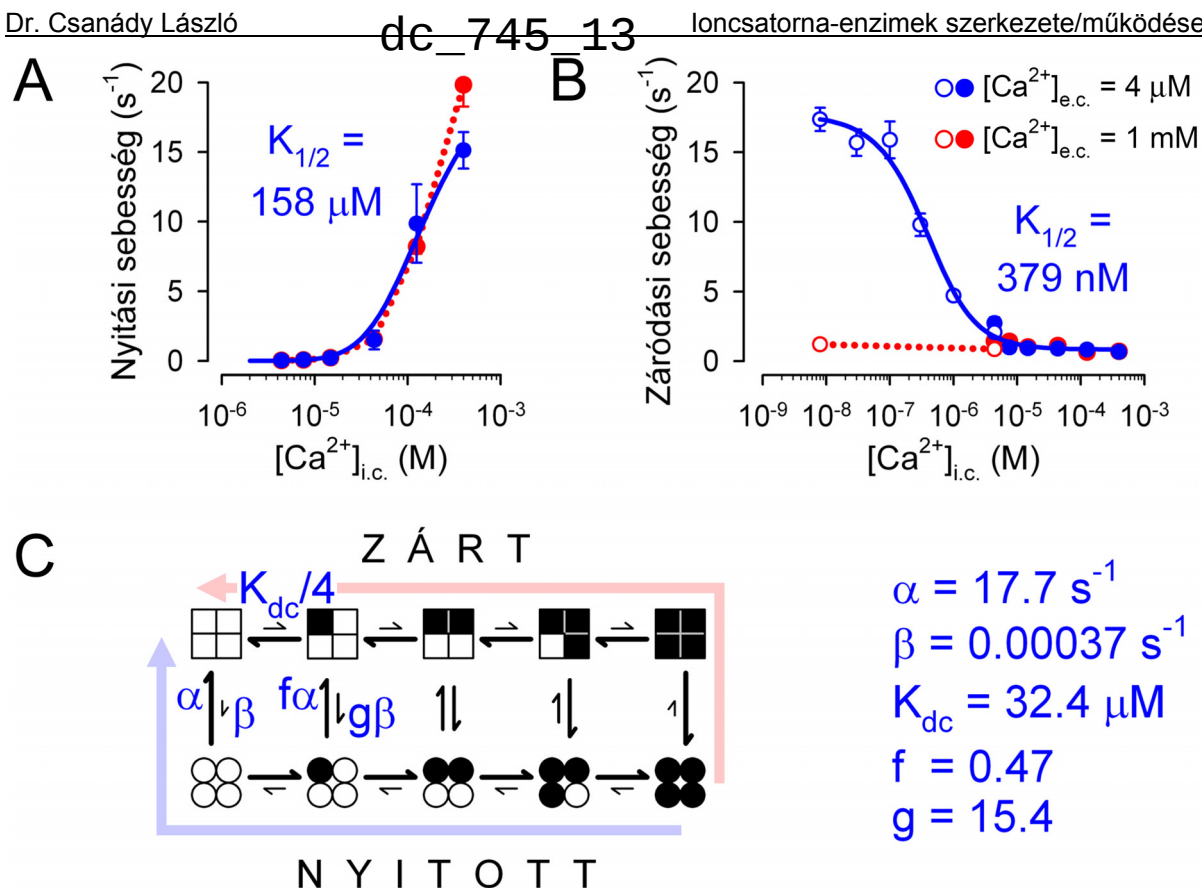
35. ábra. A TRPM2 kapuzásának alapvető tulajdonságai. **A, C**, Inside-out patch-ben, -20 mV membránpotenciálon **(A)** $125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ és emelkedő $[\text{ADPR}]$ illetve **(C)** $32 \mu\text{M ADPR}$ és emelkedő $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében aktiválódó makroszkópos WT TRPM2 áramok. A csatorna aktivitáshoz a Ca^{2+} és az ADPR együttes jelenléte szükséges. Az **(A)** ADPR illetve **(C)** Ca^{2+} elvonását követő áramrelaxációk exponenciális függvényekkel lettek illesztve (kék görbék), a sebességi állandók az ábráról leolvashatók. **B, D**, Makroszkópos WT TRPM2 áram intracelluláris **(B)** $[\text{ADPR}]$ - illetve **(D)** $[\text{Ca}^{2+}]$ -függése a másik ko-aktivátor telítési koncentrációja ($125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ illetve $32 \mu\text{M ADPR}$) mellett; az áramok az ugyanazon patch-ben $32 \mu\text{M ADPR} + 125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ jelenlétében mért áramhoz lettek normalva. A folytonos görbék a Hill egyenlet illesztését szemléltetik, az illesztett paraméterek az ábráról leolvashatók. **E**, "Rundown": a makroszkópos WT TRPM2 áram $125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ és $32 \mu\text{M ADPR}$ fenntartott jelenlétében is irreverzibilisen inaktíválódik, a folyamat időállandója rövidebb mint 1 perc (ld. piros illesztett exponenciális).

affinitása $K_{1/2} \sim 20 \mu\text{M}$ (35. C, D ábrák). Technikai kihívást jelentett a TRPM2 biofizikai vizsgálatában a kiszakított patch-ekben megfigyelhető gyors inaktiváció (időálló < 1 perc; 35. E ábra), amelyről zaj analízis segítségével megállapítottuk, hogy nem az egyes csatornák nyitvatartási valószínűségének (P_o) fokozatos csökkenését, hanem az aktív csatornák számának (N) gyors fogyását tükrözi (Csanády és Torocsik, 2009).

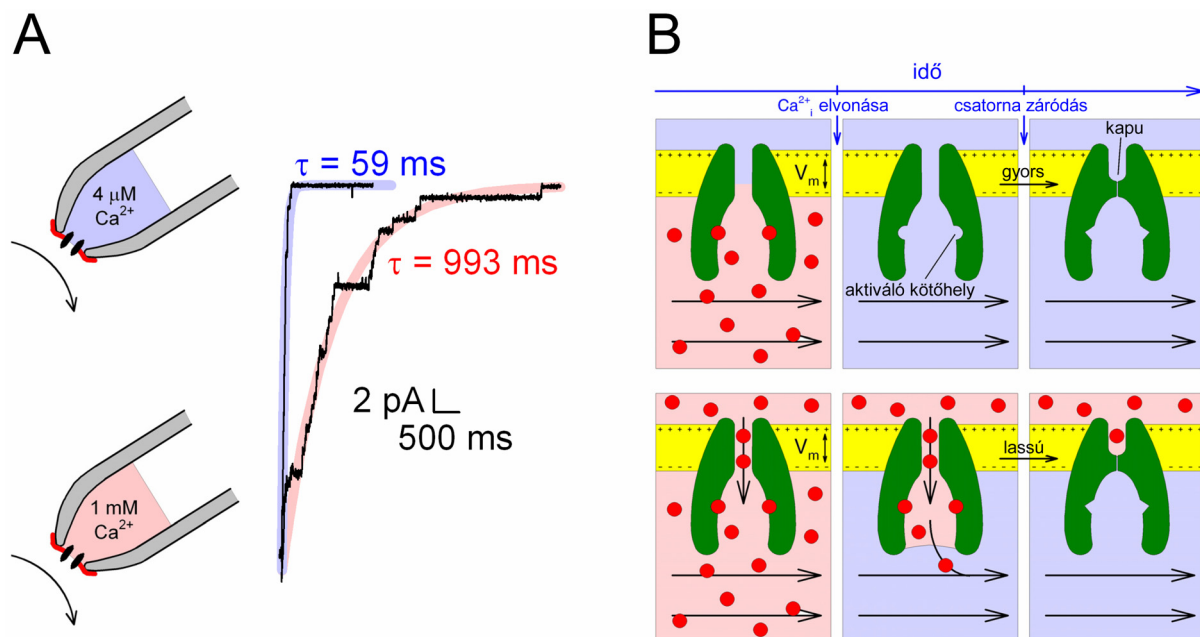
5.2.2. A TRPM2 Ca^{2+} függő szabályozása

A két azonosított obligát agonista közül elsőként a Ca^{2+} kapuzásra gyakorolt hatását vizsgáltuk részletesen, telítési ($32 \mu\text{M}$) intracelluláris $[\text{ADPR}]$ mellett. Először az intracellulárisan (kád oldatban) alkalmazott Ca^{2+} hatását vizsgáltuk alacsony ($4 \mu\text{M}$) extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében. Egyrészt, többcsatornás patch-ekben meghatároztuk az átlagos nyitási és zárási sebességek citoszolikus Ca^{2+} koncentrációfüggését (36. A és B ábrák, *telít kék körök*). Másrészt, makroszkópos mérésekben, a Ca^{2+} koncentrációt hirtelen különböző nanomólos értékekre csökkentve, a relaxációs sebességekből meghatároztuk a záródási sebességeket a nanomólos koncentrációtartományban is (36. B ábra, *üres kék körök*), amelyben a nyitási sebesség nulla. Megállapítottuk, hogy a TRPM2 csatornáknak mind a nyitási, mind a csukódási sebessége az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ függvénye; az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emelése gyorsítja a nyitást (36. A ábra; $K_{1/2}=158 \mu\text{M}$) és lassítja a csukódást (36. B ábra; $K_{1/2}=379 \text{ nM}$). E két hatás nagyon eltérő $K_{1/2}$ értéke azonban 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. E koncepció legegyszerűbb megfogalmazása egy tetramer fehérjére a Monod-Wyman-Changeux mechanizmus (36. C ábra). E modell illesztése (36. A-B ábrák, *kék illesztett görbék*) alapján a TRPM2 csatornát négy Ca^{2+} ion kötődése aktiválja; minden újabb kötődés kb. 33-szorosára növeli a nyitott és csukott állapot közötti egyensúlyi állandót, összesen kb. 10^6 -szoros aktivációt okozva (Csanády és Torocsik, 2009).

Ezután megvizsgáltuk az extracellulárisan (pipetta oldatban) alkalmazott Ca^{2+} kapuzásra gyakorolt szerepét. Kimutattuk, hogy magas (1 mM) extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenléte nincs hatással a csatornák nyitási sebességére (36. A ábra, *piros körök*), ami a zárt csatornák tulajdonsága. Ez arra utal, hogy a csatorna csukott állapotában



36. ábra. A TRPM2 kapuzásának intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -függése jól leírható a Monod-Wyman-Changeux modellel. A-B, Egyedi WT TRPM2 csatornák átlagos nyitási (A) és záródási (B) sebességének intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -függése $32 \mu M$ intracelluláris ADPR, és $4 \mu M$ (kék körök) illetve $1 mM$ (piros körök) extracelluláris (pipetta) $[Ca^{2+}]$ jelenlétében. A telt körök a 10. ábrán bemutatott módszerrel meghatározott steady-state kapuzási paraméterek. Az üres körök (B panel) az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -nak $125 \mu M$ -ról az ábrázolt ($\leq 4.4 \mu M$ -os) teszt koncentrációra történő hirtelen csökkentése kiváltotta makroszkópos áramrelaxációk időállandóinak inverzei: $\leq 4.4 \mu M$ -os intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mellett a nyitási sebesség közel nulla (ld. A panel), így e relaxációk sebességei a záródási sebességet tükrözik. Kék folytonos görbék: a C panelben szemléltetett séma legjobb illesztése az alacsony extracelluláris $[Ca^{2+}]$ mellett mért adatokra (kék körök), a látszólagos affinitások az ábráról leolvashatók. C, Monod-Wyman-Changeux modell 4 Ca^{2+} kötőhellyel (1 kötőhely/ alegység). A négyzetek zárt, a körök nyitott pórusú csatorna alegységet jelképeznek; a Ca^{2+} -ot kötött alegységek feketére vannak színezve. A modell 5 szabad paraméterének illesztett értékei a jobb oldalon láthatók. A színes nyilak az intracelluláris Ca^{2+} hirtelen elvonására bekövetkező csatornazáródás reakcióútját szemléltetik extracelluláris Ca^{2+} hiányában (világoskék nyíl; v.ö. 37A ábra, gyors relaxáció) illetve jelenlétében (rózsaszín nyíl; v.ö. 37A ábra, lassú relaxáció).

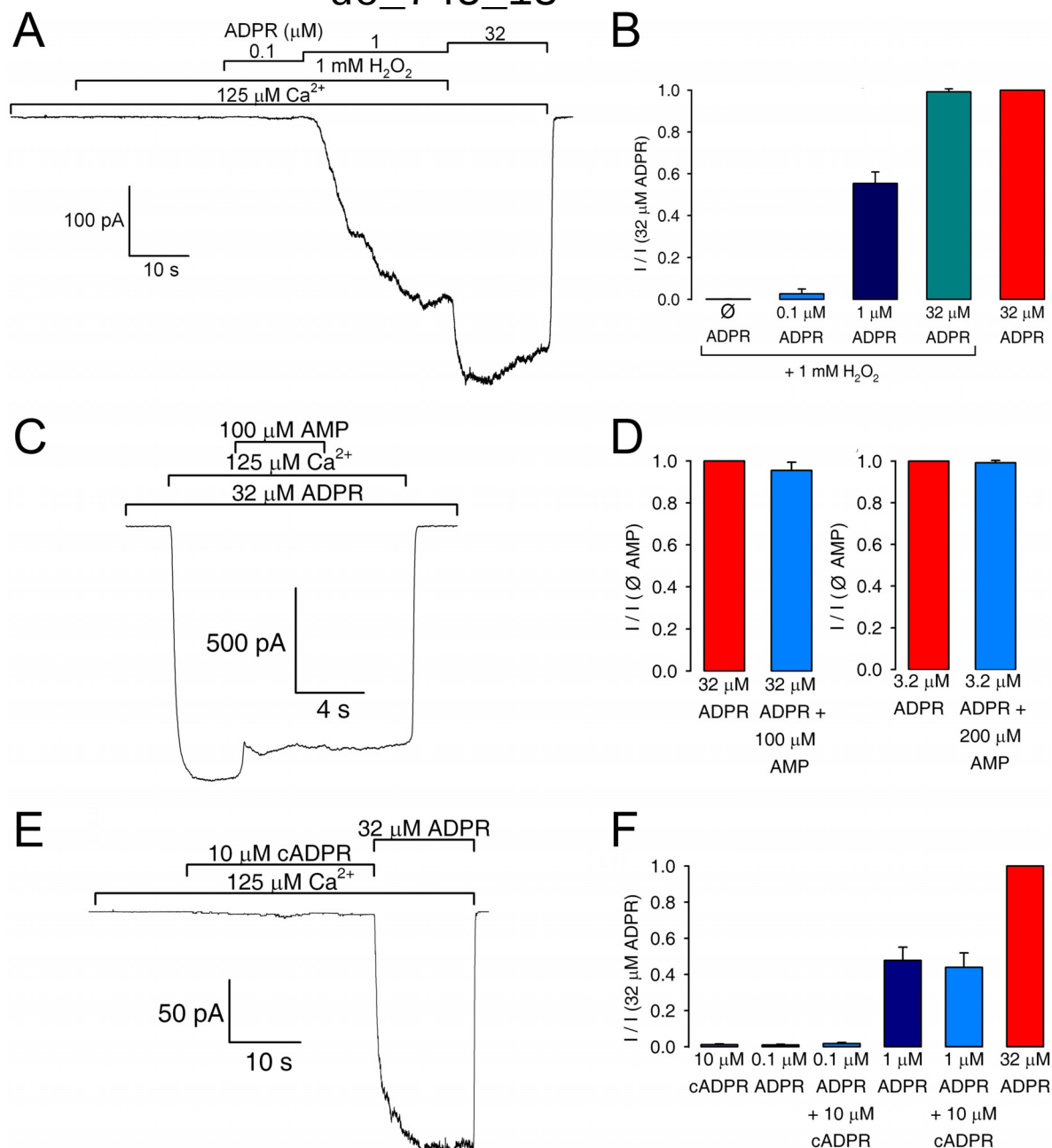


37. ábra. Az aktiváló Ca^{2+} kötőhelyek a kaputól intracellulárisan, de a pórus közvetlen közelében találhatók. **A**, 32 μM ADPR + 125 μM Ca^{2+} jelenlétében aktivált makroszkópos WT TRPM2 áramoknak az intracelluláris Ca^{2+} hirtelen elvonására bekövetkező záródási relaxációi 4 μM -os (felső séma, bal oldali görbe), illetve 1 mM-os (alsó séma, jobb oldali görbe) extracelluláris (pipetta) $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén. Membránpotenciál: -20 mV. A színes folytonos görbék exponenciális függvények illesztései, az időállandók az ábráról leolvashatók. **B**, Az extracelluláris Ca^{2+} záródási sebességre gyakorolt hatásának sematikus magyarázata. Membrán, sárga; TRPM2 csatorna pórus, zöld; Ca^{2+} -mentes oldat, világoskék; Ca^{2+} -tartalmú oldat, rózsaszín; Ca^{2+} ionok, piros körök. Az intracelluláris oldat folyamatos áramlását fekete nyilak jelzik. (Fent) Extracelluláris Ca^{2+} hiányában az intracelluláris Ca^{2+} hirtelen elmosására az aktiváló kötőhelyek azonnal elveszítik a Ca^{2+} -ot, ezért a csatornák gyorsan záródnak (v.ö., A panel, bal oldali görbe; 36. C panel, világoskék nyíl). (Lent) Extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében az intracelluláris Ca^{2+} hirtelen elmosását követően a póruson beömlő Ca^{2+} ionok mindaddig telítésben tartják az aktiváló kötőhelyeket, amíg a kapu be nem zárul: a csatornák ezért csak lassan záródnak (v.ö., A panel, jobb oldali görbe; 36. C panel, rózsaszín nyíl).

az extracelluláris Ca^{2+} nem fér hozzá az aktiváló kötőhelyekhez: azaz, e kötőhelyek a kaputól intracellulárisan találhatók. Ugyanakkor 1 mM külső Ca^{2+} jelenléte jelentősen lassította a belső Ca^{2+} hirtelen elmosását követő záródást (37. A ábra; 36. B ábra, *üres piros körök*). E jelenség a következőképpen magyarázható. Külső Ca^{2+} hiányában a belső Ca^{2+} hirtelen elmosásakor a kötőhelyek, amelyek a kaputól intracellulárisan találhatók, azonnal elveszítik a Ca^{2+} -ot: ilyenkor a ligandmentes csatornák gyors záródási sebességét észleljük (37. B ábra, *felső eseménysor*; 36. C ábra, *világoskék nyíl*-lal jelölt reakcióút). A Ca^{2+} kötőhelyek tehát mind csukott, mind nyitott állapotban szabadon hozzáférhetők az intracelluláris oldat számára. Ezzel szemben, külső Ca^{2+} jelenlétében a nyitott póruson beömlő Ca^{2+} – még az intracelluláris felszín Ca^{2+} -mentes oldattal történő folyamatos, gyors mosása mellett is – telítésben képes tartani az aktiváló kötőhelyeket: ilyenkor a ligandkötött csatornák lassú záródását észleljük, és az aktiváló kötőhelyek csak a záródást követően veszítik el a Ca^{2+} -ot (37. B ábra, *alsó eseménysor*; 36. C ábra, *rózsaszín nyíl*-lal jelölt reakcióút). Ezt a következtetést megerősíti, hogy pozitívabb membránpotenciálok alkalmazásakor az extracelluláris Ca^{2+} kapuzásra gyakorolt hatása a Ca^{2+} beáramlás hajtóerejének csökkenésével arányosan mérséklődik. Az aktiváló kötőhelyek tehát a csatorna kapujától ugyan intracelluláris irányban helyezkednek el, de valószínűleg nem a csatorna fehérje felszínén, hanem egy mély üregben (vesztibulumban), a pórus bemenetének közvetlen közelében ((Csanády és Torocsik, 2009); e közleményünk összefoglaló ábrája [37. ábra] a *Journal of General Physiology* folyóirat címlapjára került).

5.2.3. A TRPM2 egyéb modulátorai

A két obligát agonista, az ADPR és a Ca^{2+} , mellett megvizsgáltuk több más olyan vegyület hatásait is, amelyek intakt sejtekben befolyásolták a TRPM2 áramok nagyságát. Először is megállapítottuk, hogy – intakt sejtekkel ellentétben – izolált patch membránban a H_2O_2 nem aktiválja a TRPM2-t (38. A ábra) és nem befolyásolja az ADPR-kiváltotta aktivitást (38. B ábra, v.ö., 35. B ábra). Úgyszintén nem hatott a TRPM2 aktivitásra izolált patch-ben az AMP sem (38. C-D ábrák). A cADPR hatásának vizsgálatát megnehezítette, hogy vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat alapján a kereskedelmi forgalomban kapható cADPR-t ADPR-zal erősen szennyezettnek találtuk. Az ADPR szennyeződéstől enzimatis bontással



38. ábra. A H_2O_2 , az AMP és a cADPR nem hatnak közvetlenül a TRPM2 csatorna kapuzására. **A**, Inside-out patch-ben, telítési intracelluláris Ca^{2+} jelenlétében, 1 mM H_2O_2 intracelluláris alkalmazása nem aktivál WT TRPM2 áramot, és nem befolyásolja az ADPR-kiváltotta makroszkópos TRPM2 áram [ADPR]-függését. Membránpotenciál: -20 mV. **B**, Különböző ADPR koncentrációk relatív hatása 125 μM Ca^{2+} és 1 mM H_2O_2 jelenlétében. A teszt körülmények között mért steady-state makroszkópos WT TRPM2 áramok az ugyanazon patch-ben 32 μM ADPR + 125 μM Ca^{2+} jelenlétében aktivált áramokhoz (*piros oszlop*) lettek normálva. **C**, Inside-out patch-ben telítési intracelluláris Ca^{2+} (125 μM) és ADPR (32 μM) jelenlétében 100 μM AMP intracelluláris alkalmazása nem gátolja a WT TRPM2 áramot.

38. ábra (folytatás)... Membránpotenciál: -20 mV. **D**, 100 μ M AMP relatív hatása 32 μ M ADPR jelenlétében (*bal kék oszlop*) illetve 200 μ M AMP relatív hatása 3.2 μ M ADPR jelenlétében (*jobb kék oszlop*). Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ 125 μ M volt. A teszt körülmények között mért steady-state makroszkópos TRPM2 áramok az ugyanazon patch-ben 32 illetve 3.2 μ M ADPR + 125 μ M Ca^{2+} jelenlétében aktivált áramokhoz (*piros oszlopok*) lettek normálva. **E**, Inside-out patch-ben telítési intracelluláris Ca^{2+} jelenlétében 10 μ M tisztított cADPR intracelluláris alkalmazása nem aktivál WT TRPM2 csatornákat, bár ugyanezen patch-ben 32 μ M ADPR makroszkópos TRPM2 áramot vált ki. Membránpotenciál: -20 mV. **F**, 10 μ M tisztított cADPR hatása a különböző ADPR koncentrációk és 125 μ M Ca^{2+} kiváltotta relatív áramokra. A teszt körülmények között mért steady-state makroszkópos TRPM2 áramok az ugyanazon patch-ben 32 μ M ADPR + 125 μ M Ca^{2+} jelenlétében aktivált áramokhoz (*piros oszlop*) lettek normálva.

megszabadított "tisztított" cADPR azonban nem aktivált (38. E ábra), és nem befolyásolta az ADPR-kiváltotta aktivitást sem (38. F ábra, v.ö., 35. B ábra). Az NAADP és az NAAD esetében vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálataink nem mutattak ki jelentős ADPR szennyeződést, viszont mindkét nukleotid csak a fiziológiásnál több nagyságrenddel magasabb koncentrációban aktiválta a TRPM2 csatornákat ($K_m=100$ illetve 30 μ M). Tehát a H_2O_2 , AMP, cADPR, NAADP, és NAAD nem közvetlenül a TRPM2 fehérjéhez kötődnek: az irodalomban közölt sejtszintű hatásaik részben közvetett hatások, amelyek az elsődleges agonisták (az ADPR és a Ca^{2+}) lokális koncentrációinak befolyásolja révén valósulnak meg, részben pedig a kereskedelembe kapható készítmények ADPR szennyeződését tükrözik (Tóth és Csanády, 2010).

5.2.4. A TRPM2 inaktivációjának mechanizmusa

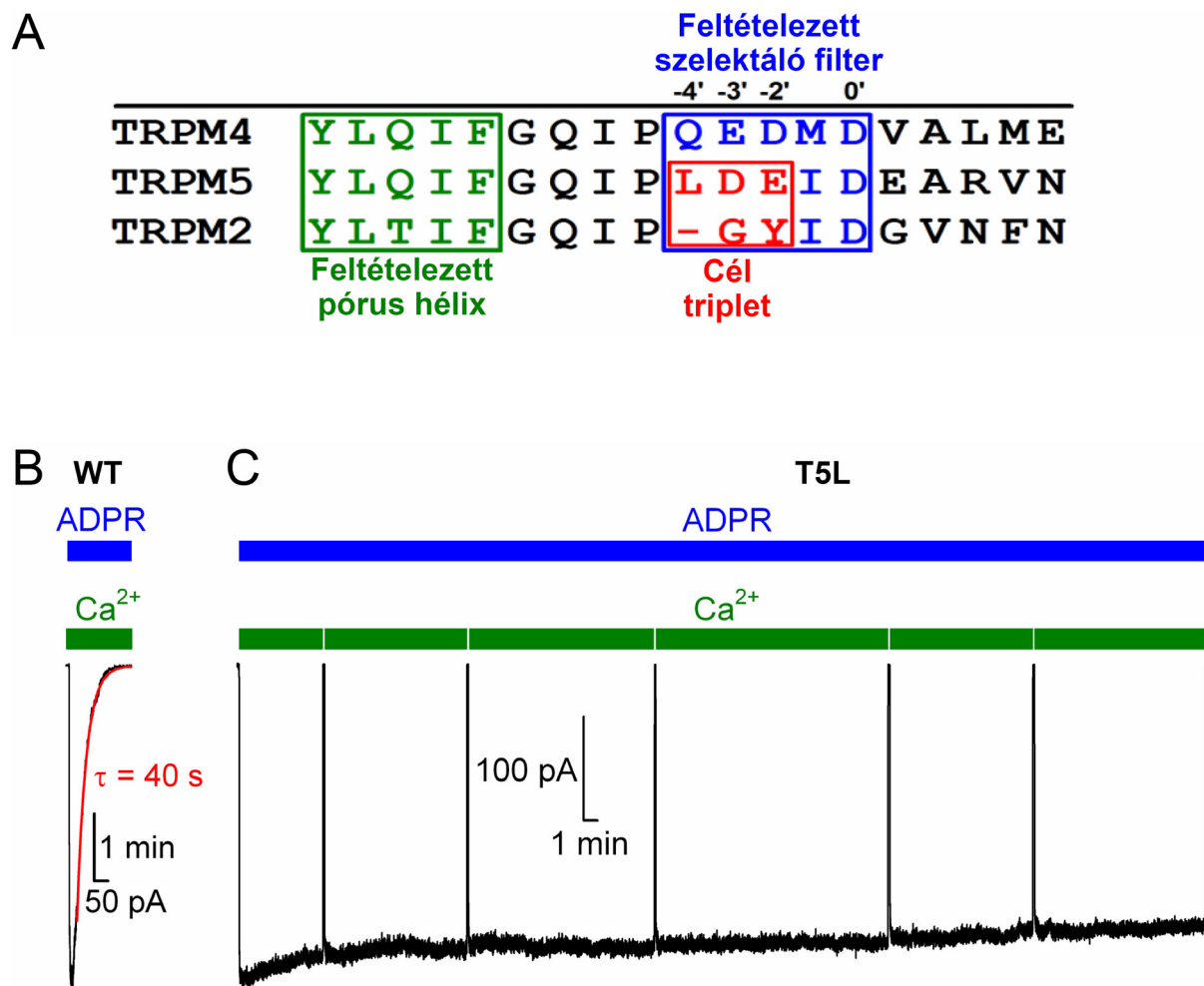
A WT TRPM2 spontán gyors inaktivációjának mechanizmusát tanulmányozva észrevettük, hogy e folyamat sebessége állapotfüggő, valamint függ a permeáló ionok fajtájától és koncentrációjától – ez valószínűsítette a szelektáló filter szerepét ebben a folyamatban. A rokon TRPM4 és TRPM5 csatornákéval összevetve a TRPM2 filterszekvenciáját (39. A ábra, *kék keret*) feltűnt, hogy a TRPM2 filtere egy deléciót tartalmaz, illetve hiányzik belőle két konzervált, negatív töltésű oldallánc (39.

A ábra, *piros keret*). E három pozícióba (39. A ábra, "Cél triplet") a rokon TRPM5 csatorna megfelelő aminosavait (Leu - Asp - Glu) helyettesítve létrehoztunk egy "TRPM5-like" (T5L) tripla mutánst. Ez a pórusmutáció teljesen megszüntette a WT csatornák esetében telítési Ca^{2+} és ADPR fenntartott jelenlétében is megfigyelhető inaktivációt (v.ö. 39. B és C ábrák), ami arra utal, hogy a WT TRPM2 inaktivációja a szelektálófilter konformációváltozásának következménye. Mivel a T5L mutáció mindemellett nem változtatta meg a kapuzás Ca^{2+} - és ADPR-függését, e pórusmutáns kiváló modell a kapuzási kinetika steady-state körülmények közötti vizsgálatához (Tóth és Csanády, 2012).

5.2.5. A TRPM2 PIP_2 -függő szabályozása

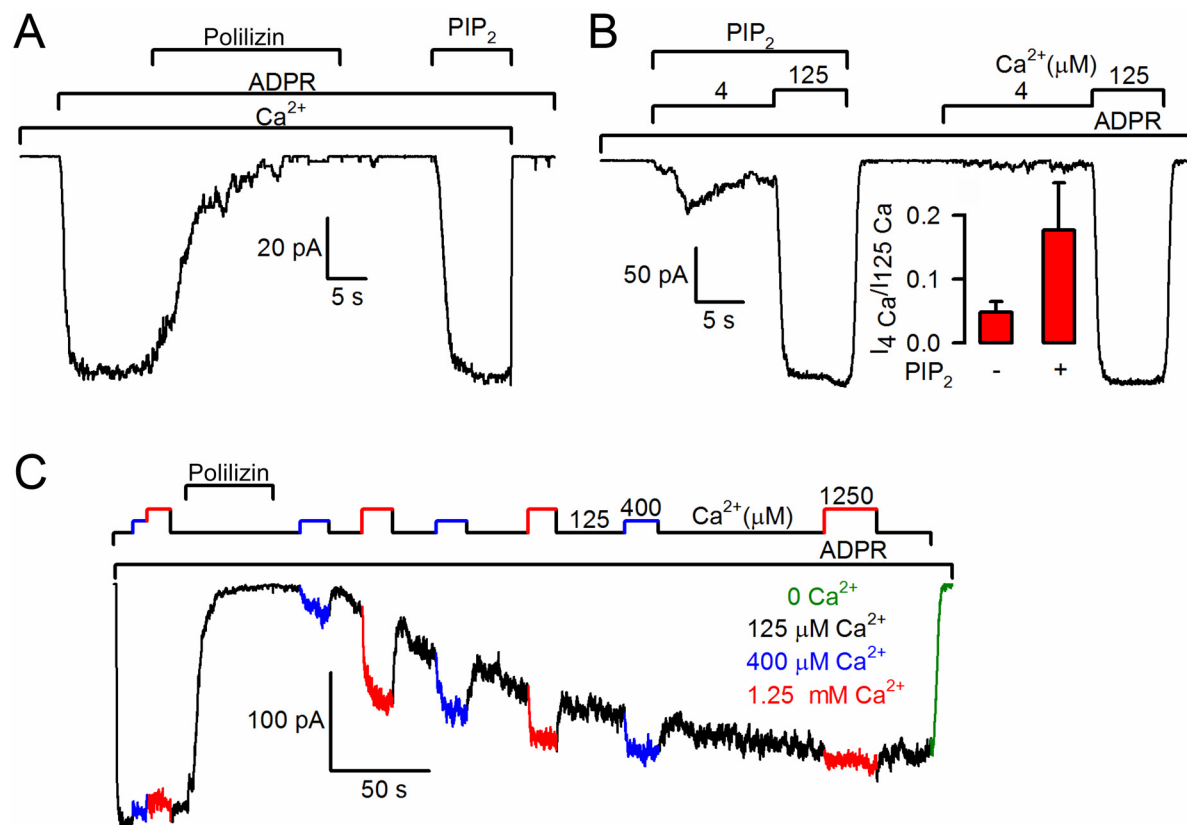
A foszfatidil-inozitol biszfoszfát (PIP_2) a membrán belső rétegében található foszfolipid, amely sok kation csatornához kötődik, és befolyásolja azok kapuzását (Huang és mtsai., 1998; Hansen és mtsai., 2011). Miután a PIP_2 több rokon TRPM típusú csatornát is szabályoz (Rohacs és Nilius, 2007), megvizsgáltuk esetleges hatását a TRPM2-re. Az intracelluláris membránfelszínt a polikation polilizinnel kezelve a PIP_2 negatív töltésű feji csoportjai eltakarhatók. Megmutattuk, hogy a szabad PIP_2 e módszerrel történő teljes depléciója bezárja a TRPM2 csatornákat, amelyek azonban a polilizin elmosását követően exogén PIP_2 alkalmazásával azonnal újra megnyithatók (40. A ábra). Fokozatosan, percek alatt, akkor is újraaktiválódnak a csatornák, ha csak elmosuk a polilizint, amely feltehetően lassan ledisszociál a membránról, újra szabaddá téve az endogén PIP_2 -t (40. C ábra). (Ezeket a kísérleteket T5L csatornákon végeztük, amelyek hosszú megfigyelést tettek lehetővé.)

A polilizin elmosását közvetlenül követő átmeneti időszakban, amikor a szabad PIP_2 felszíni sűrűsége még rendkívül kicsi, a csatornák mégis megnyithatók voltak, de ehhez rendkívül magas, millimólos Ca^{2+} koncentrációt kellett alkalmazni (40. C ábra, *kék és piros szakaszok*): méréseink szerint a PIP_2 teljes depléciója 50-szeresére (~ 1 mM-ra) növelte az aktiváló Ca^{2+} $K_{1/2}$ értékét (v.ö., 40. C ábra, a polilizin elvonását követő első *piros szakasz*). Ugyanakkor, ha polilizin nélkül alkalmaztunk nagy mennyiségű exogén PIP_2 -t, akkor a Ca^{2+} $K_{1/2}$ értéke csak kis mértékben, kb. felére, csökkent (40. B ábra, *oszlop diagram*, 50 μM PIP_2



39. ábra. A T5L pórusmutáció kiküszöböli a TRPM2 csatornák inaktivációját.

A, A TRPM4, TRPM5, és TRPM2 csatornák szelektálófilterét tartalmazó szekvencia szakaszok összehasonlítása. A pórus hélixet zöld, a szelektáló filtert kék, a T5L TRPM2 konstrukcióban megváltoztatott 3 pozíciót piros keret emeli ki. A T5L TRPM2 szelektáló filtere 3 mutáció révén (G984D, Y985E, leucin inzerció a 984-es pozíció előtt) a TRPM5 szelektálófilterével vált azonossá. **B**, Makroszkópos WT TRPM2 áram 32 μ M ADPR + 125 μ M Ca²⁺ jelenlétében 1 percen belül inaktiválódik. **C**, Makroszkópos T5L TRPM2 áram 32 μ M ADPR + 125 μ M Ca²⁺ jelenlétében 1 óra elteltével sem csökken lényegesen; a csatornák időközönkénti rövid Ca²⁺ elvonásokkal kiváltott záródásai a patch tapadási ellenállásának változatlan fennállását igazolják. A B, és C panelben a membránpotenciál -20 mV.



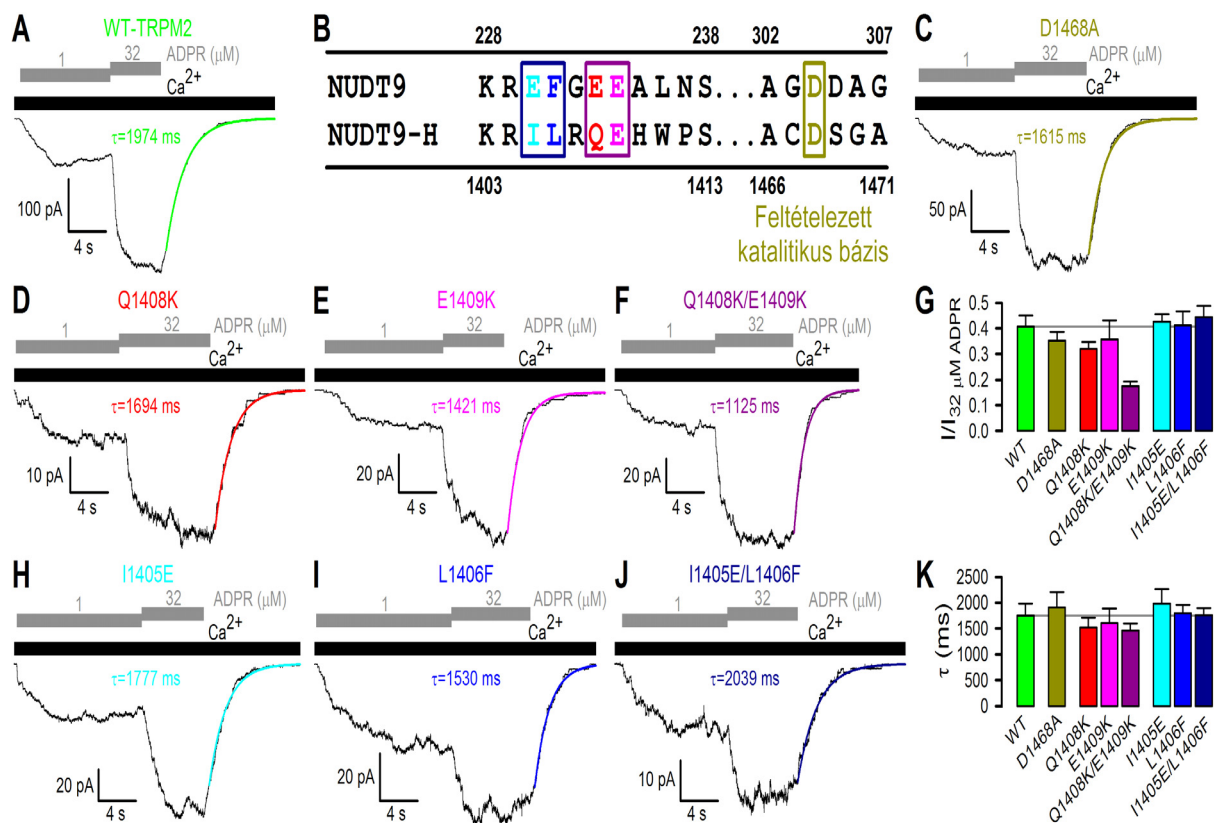
40. ábra. A membrán szabad PIP₂ tartalmának teljes lefedése bezárja a TRPM2 csatornákat. **A**, 32 μM ADPR + 125 μM Ca²⁺ aktiválta makroszkópos T5L TRPM2 áram 15 μg/ml polilizin rövid alkalmazására elenyészik, de a szabad polilizin elmosását követően 50 μM dioktanoil-foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) segítségével helyreállítható. **B**, 50 μM dioktanoil-foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) alkalmazásának mérsékelt hatása makroszkópos T5L TRPM2 áram 4 μM intracelluláris Ca²⁺ kiváltotta relatív aktivációjára (32 μM ADPR jelenlétében). Oszlop diagram: az áramok az ugyanazon patch-ben 32 μM ADPR + 125 μM Ca²⁺ jelenlétében mért áramhoz lettek normálva. **C**, Makroszkópos T5L TRPM2 áram 32 μM ADPR és 125, 400, illetve 1250 μM Ca²⁺ alkalmazása közben. Polilizin (15 μg/ml) rövid alkalmazására az áram elenyészik, de a szabad polilizin elmosását követően lassan spontán reaktiválódik. A polilizin alkalmazása előtt, illetve a reaktiváció után, 125 μM Ca²⁺ maximálisan, míg közvetlenül a polilizin alkalmazását követően 1250 μM Ca²⁺ is csak kb. félmáximálisan, aktivál. A membránpotenciál mindhárom panelben -20 mV.

jelenlétében a Ca^{2+} becsült $K_{1/2}$ értéke $\sim 10 \mu\text{M}$). Ez arra utal, hogy a TRPM2 erősen köti a PIP_2 -t, hiszen egy kiszakított membránfolt PIP_2 koncentrációja eleve alacsony, mégis közel maximális Ca^{2+} affinitást ($K_{1/2} \sim 20 \mu\text{M}$; (Csanády és Torocsik, 2009)) biztosít a csatornának. Ez magyarázhatja azt, hogy a T5L mutáns aktivitása Ca^{2+} és ADPR jelenlétében még a patch kiszakítását követő 1 óra alatt sem csökken lényegesen (39. C ábra), bár a membrán szabad PIP_2 tartalma a kiszakítást követően percek alatt elenyészik (Tóth és Csanády, 2012).

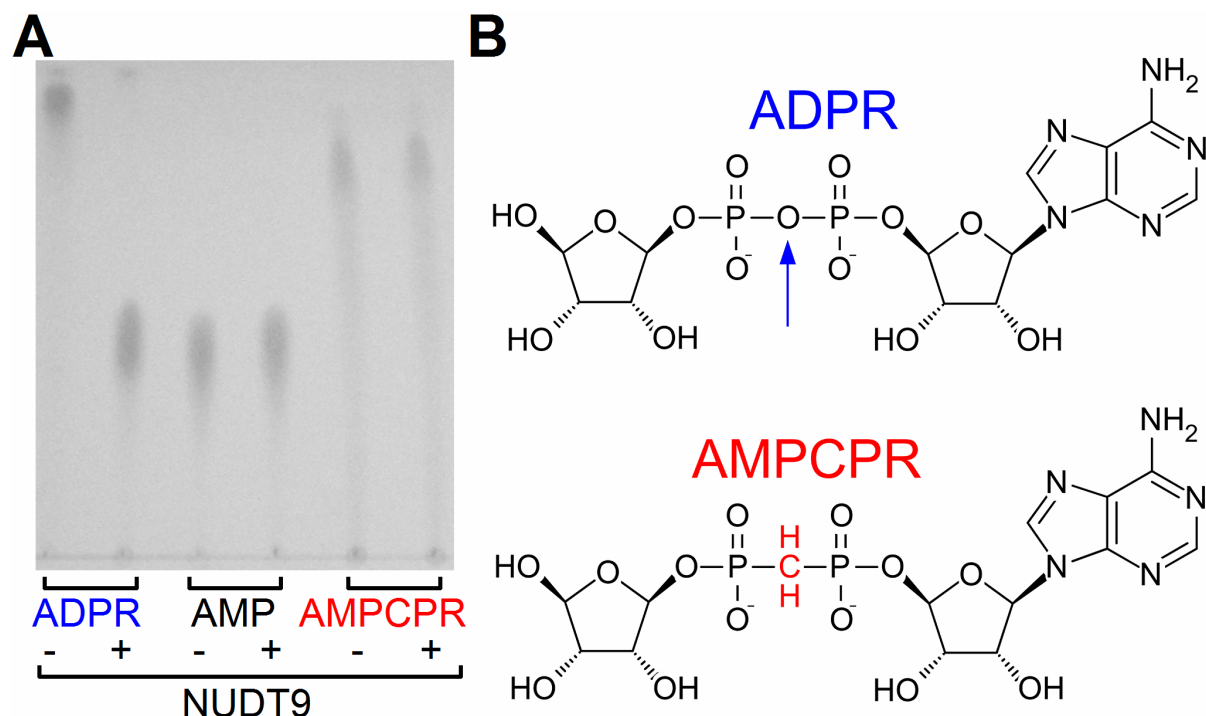
5.2.6. A TRPM2 ADPR-függő szabályozása

A TRPM2 csatornát aktiváló ADPR-t a csatorna intracelluláris karboxi-terminális NUDT9-H doménje köti (7A ábra, szürke), amely $\sim 40\%$ szekvencia homológiát mutat a NUDT9 nevű mitochondriális ADPRáz enzimmel (7. C ábra). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az izolált NUDT9-H domén is aktív ADPRáz (7. B ábra; (Perraud és mtsai., 2001; Perraud és mtsai., 2003)), 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 ($\sim 0.5 \text{ s}^{-1}$; 35. A ábra) az ADPR hasítás sebességét tükrözné. E kérdés tisztázása érdekében ellenőrizni kívántuk, hogy a csatorna leírt enzimatisz aktivitása valós-e, illetve, hogy mi módon kapcsolódik a csatorna kapuzásához.

Először megvizsgáltuk, hogy a NUDT9-H domén pontmutációi miképpen hatnak a TRPM2 csatorna kapuzására. Az ADPRázok konzervált "Nudix-box" motívuma (41. B ábra; 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 (Perraud és mtsai., 2003). 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 ($\sim 1 \mu\text{M}$) és az ADPR elvonását



41. ábra. A TRPM2 feltételezett katalitikus hely mutációi nem befolyásolják a csatornák kapuzását. **A, C, D-F, H-J,** Inside-out patch-ben, -20 mV membránpotenciálon, $125 \mu\text{M}$ Ca^{2+} jelenlétében 1 illetve $32 \mu\text{M}$ ADPR kiváltotta makroszkópos **(A)** WT, **(C)** D1468A, **(D)** Q1408K, **(E)** E1409K, **(F)** Q1408K/E1409K, **(H)** I1405E, **(I)** L1406F, illetve **(J)** I1405E/L1406F TRPM2 áramok. Az ADPR elvonását követő áramrelaxációk exponenciális függvényekkel lettek illesztve (színes görbék), az időállandók az ábrákról leolvashatók. **B,** A NUDT9 enzim és a NUDT9-H domén Nudix-box motívumának és környezetének szekvencia összehasonlítása. A mutációkkal célzott 4 Nudix-box pozíciót és a feltételezett katalitikus bázist színes keretek emelik ki. **G,** A WT TRPM2 és a katalitikus hely mutánsok relatív aktivitásai $1 \mu\text{M}$ ADPR (és $125 \mu\text{M}$ Ca^{2+}) jelenlétében; a teszt áramok az ugyanazon patch-ben $32 \mu\text{M}$ ADPR + $125 \mu\text{M}$ Ca^{2+} jelenlétében mért áramhoz lettek normálva. **K,** A WT TRPM2 és a katalitikus hely mutánsok ADPR elvonását követő makroszkópos relaxációs időállandói.

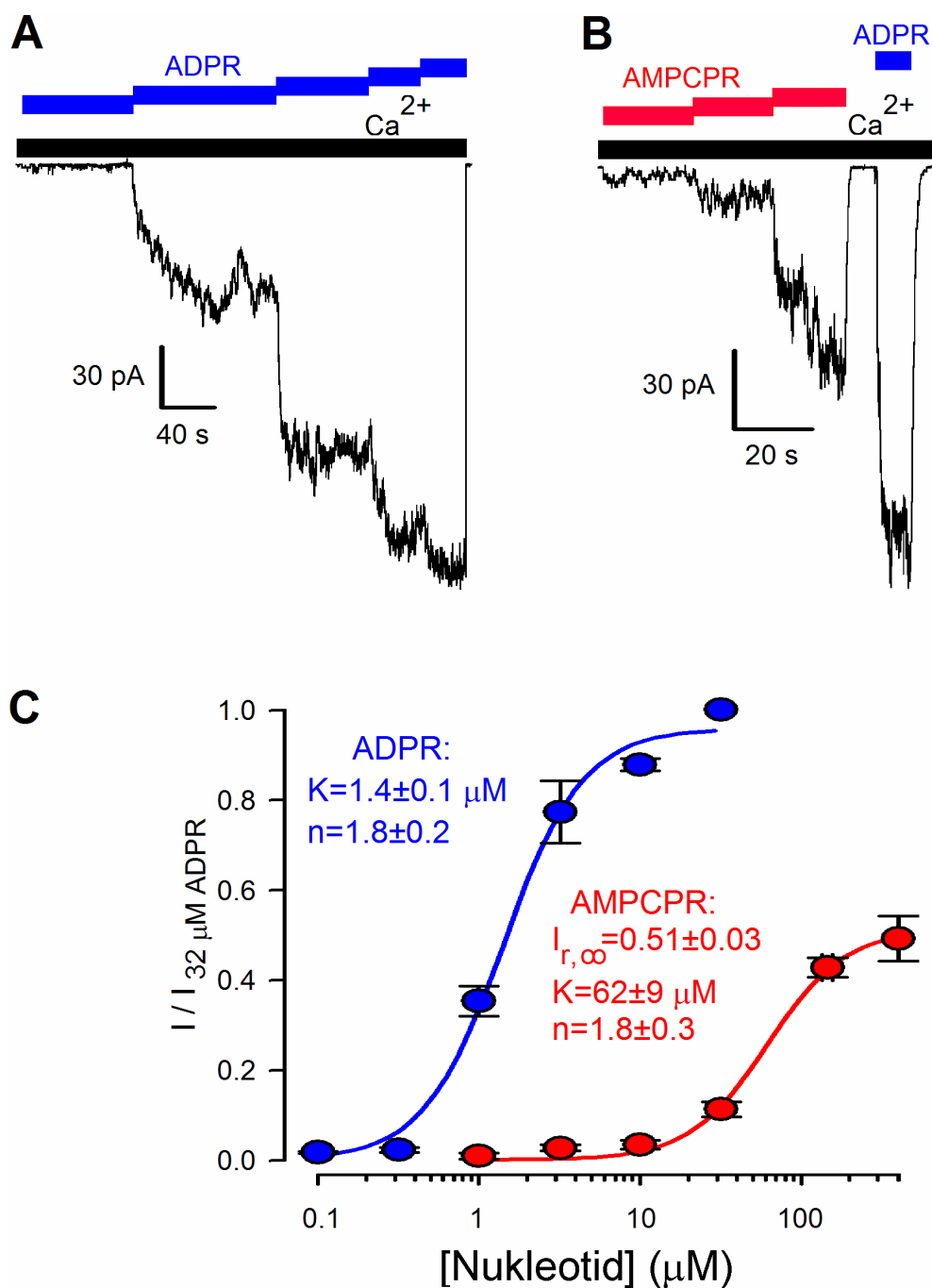


42. ábra. Az AMPCPR nem-hidrolizálható ADPR analóg. A, ADPR, AMP, és AMPCPR minták vékonyréteg kromatográfiás analízise NUDT9 enzimmel történt inkubáció előtt (-) és után (+). Az enzim az ADPR-t AMP-re és ribóz-5-foszfátra bontja, utóbbi nem fluoreszkál, ezért nem látható a kromatogramon. Az AMPCPR nem hasítható. **B,** Az ADPR és az AMPCPR szerkezeti képletei; a kék nyíl az ADPR-ban a NUDT9 enzim által hidrolizált oxigén hidat jelöli.

követő csukódási sebességet (41. D-F és H-J ábrák, v.ö. 41. A ábra). Ugyancsak nem volt hatása a kapuzásra a feltételezett katalitikus bázisként működő aszpartát oldallánc csonkításának (D1468A) sem (41. C ábra).

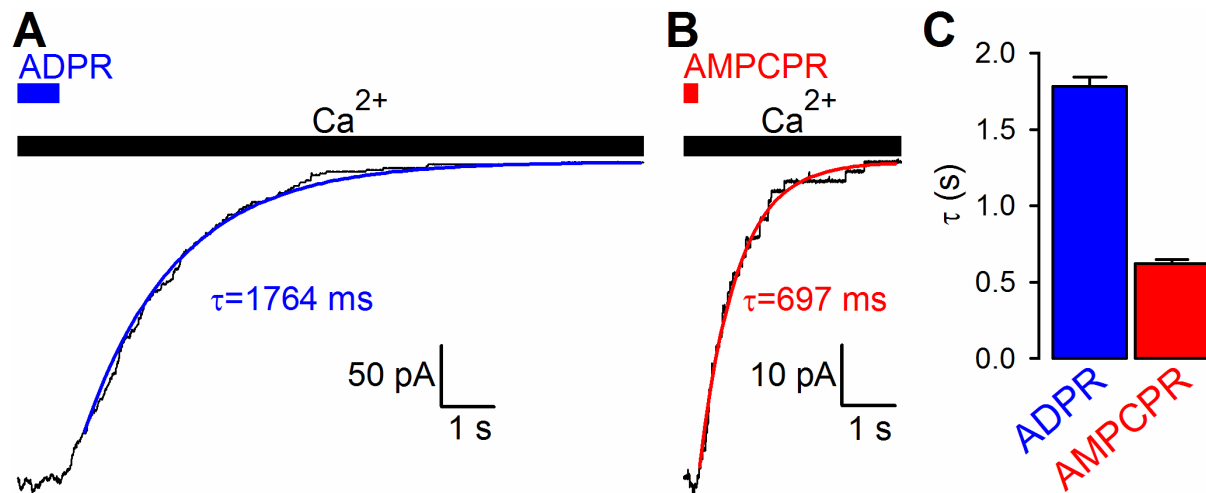
A fenti mutációk kapuzásra kifejtett hatásának hiányát (41. G és K ábrák) egyaránt magyarázhatja, (a) ha a NUDT9-H domén eleve katalitikusan inaktív, (b) ha az ADPR hasításának nincs hatása a kapuzásra, vagy (c) ha a vizsgált Nudix-box oldalláncok nem szükségesek a katalízishez (a homológ NUDT9 enzim kristályszerkezete felvetette, hogy a katalízis kémiai mechanizmusa nem teljesen konzervált az ADPRázok között; (Shen és mtsai., 2003)). A kérdés alternatív megközelítéseként ezért, kollaboráció keretében (Dr. Krzysztof Felczák, University of Minnesota), megszintetizáltunk egy nem-hidrolizálható ADPR analógot, amelyben az α és β foszfátokat metilén-híd köti össze (AMPCPR; 42. B ábra). Miután vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatokkal ellenőriztük, hogy az AMPCPR-t még a NUDT9-H doménál kb. 100-szor aktívabb NUDT9 enzim sem képes elhasítani (42. A ábra), megvizsgáltuk ezen analóg hatását a TRPM2 csatornákra. Az ADPR-hoz (42. A ábra) hasonlóan, az AMPCPR is alkalmasnak bizonyult a csatornák megnyitására (43. B ábra), bizonyítva ezzel, hogy a ligand elhasítása nem feltétele a pórus megnyílásának. Ugyanakkor, az AMPCPR az ADPR-éhoz képest kb. 40-szer alacsonyabb látszólagos affinitással aktivált (43. C ábra), és csak részleges agonistának bizonyult, azaz telítési koncentrációban is csak kb. fele akkora nyitvatartási valószínűséget biztosított mint az ADPR (43. C ábra). Másrészt, ha a ligand elhasítása a pórus záródásának lenne feltétele, akkor az AMPCPR által megnyitott csatornák várhatóan hosszabb ideig maradnának nyitva. Ezzel szemben, az AMPCPR elvonását követő záródási sebesség (44. B ábra) az ADPR elvonását követőéhez (44. A ábra) képest kb. 3-szor gyorsabbnak mutatkozott (44. C ábra): a ligand elhasítása tehát 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 egyszerű egyensúlyi folyamat (Tóth és mtsai., 2014).

A nukleotidok stimuláló hatásmechanizmusának alaposabb megértése céljából megvizsgáltuk egyedi TRPM2 csatornák steady-state kapuzási kinetikájának nukleotid koncentráció-függését telítési (125 μM) intracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (45. ábra). Mind alacsony (1 μM , 45. A ábra), mind telítési (32 μM , B ábra) ADPR



43. ábra. Az AMPCPR részleges agonistaként aktiválja a TRPM2 csatornákat.

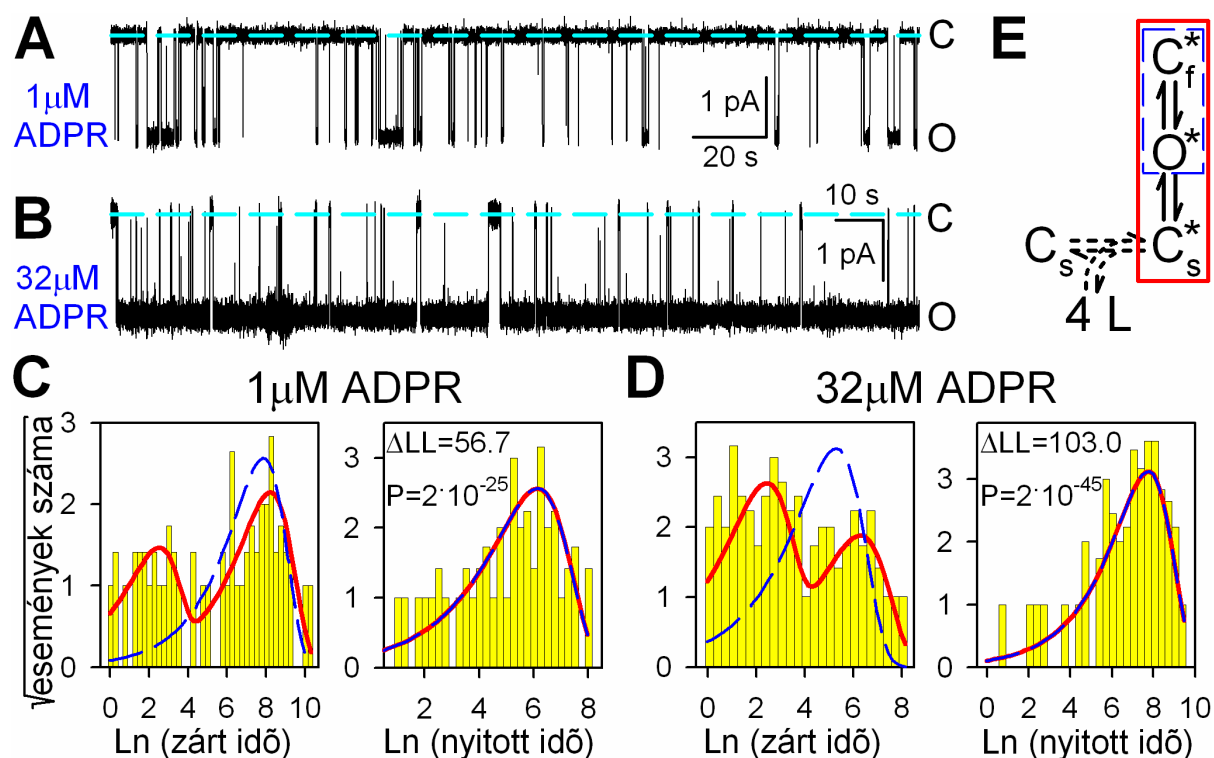
A, B, Inside-out patch-ben, -20 mV membránpotenciálón $125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ és (**A**) 0.32 , 1 , 3.2 , 10 , és $32 \mu\text{M ADPR}$ (kék tört sáv) illetve (**B**) 10 , 32 , és $200 \mu\text{M AMPCPR}$ (piros tört sáv) jelenlétében aktiválódó makroszkópos T5L TRPM2 áramok. **C**, Makroszkópos T5L TRPM2 áram intracelluláris $[\text{ADPR}]$ - (kék körök) illetve $[\text{AMPCPR}]$ -függése (piros körök) $125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ mellett; az áramok az ugyanazon patch-ben $32 \mu\text{M ADPR} + 125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ jelenlétében mért áramhoz lettek normalva. A folytonos görbék a Hill egyenlet illesztését szemléltetik, az illesztett paraméterek az ábráról leolvashatók.



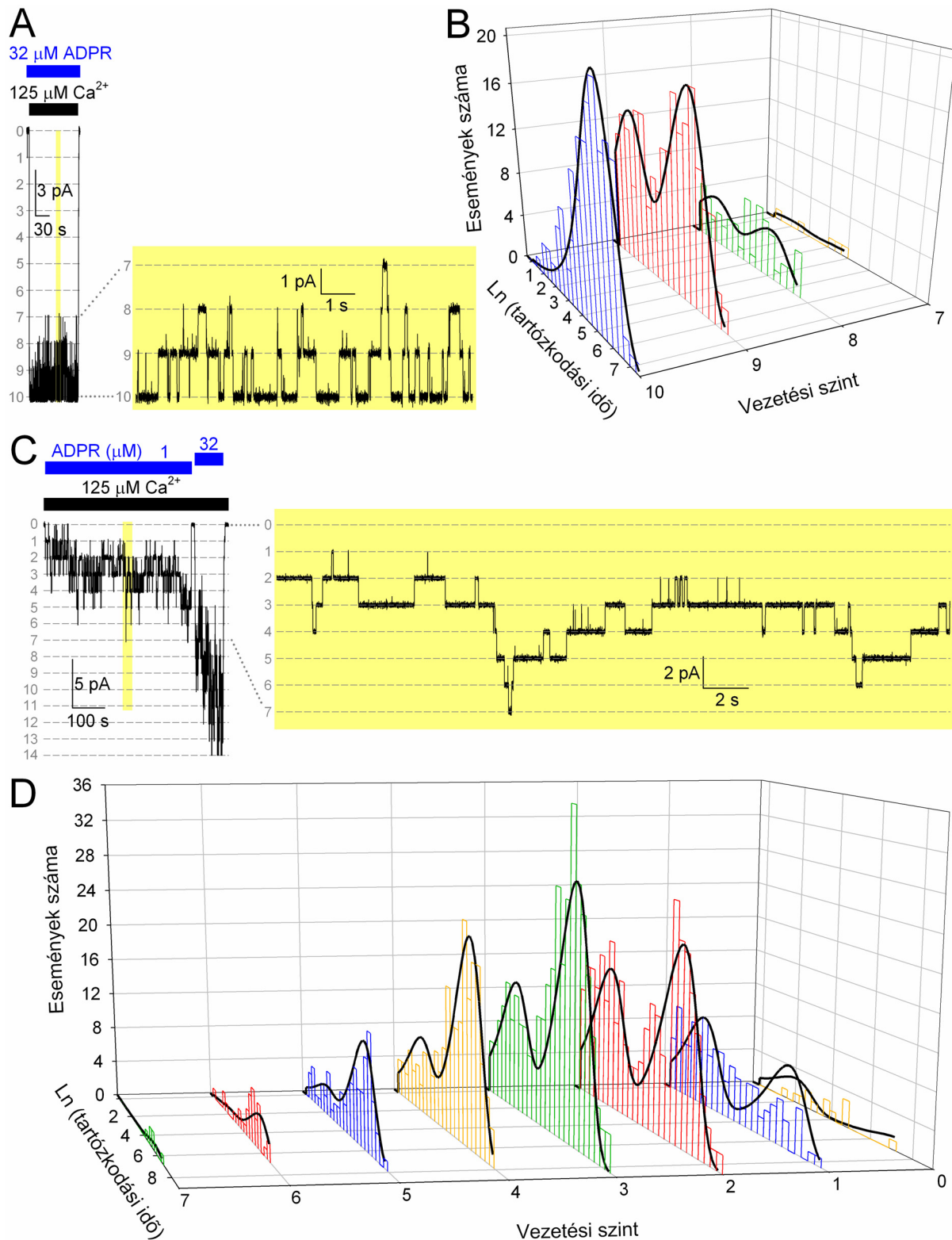
44. ábra. Az AMPCPR aktiválta TRPM2 csatornák záródási sebessége gyorsabb. A, B, Telítési Ca^{2+} és **(A)** ADPR illetve **(B)** AMPCPR által -20 mV membránpotenciálon kiváltott makroszkópos T5L TRPM2 áramok lecsengései a nukleotid hirtelen elvonását követően. *A színes görbék exponenciális függvények illesztései, az időállandók az ábrákról leolvashatók.* **C,** Az ADPR *(kék oszlop)* illetve AMPCPR *(piros oszlop)* által megnyitott csatornák nukleotid elvonását követő deaktivációjának időállandói.

koncentráció mellett meghatároztuk a csatornák nyitási és csukási idő eloszlásait (45. C és D ábrák, *sárga hisztogramok*). Míg a nyitási idők eloszlásai (45. C, D ábrák, *jobb panelek*) monoexponenciálisnak bizonyultak, addig a csukási idők eloszlásai (45. C, D ábrák, *bal panelek*) mindkét ADPR koncentráció mellett két egyértelműen elkülöníthető exponenciális komponenst tartalmaztak, ami a kapuzás "bursting" jellegét tükrözi: a CFTR-hez hasonlóan a TRPM2 csatornák esetében is megfigyelhetők a hosszú, >100 ms időtartamú "interburst" póruszáródások mellett rövid, ~5 ms időtartamú "flickery" záródások is, amelyek a hosszú nyitási eseményeket "burst"-ökre szabdalják fel. Az interburst záródások átlagos időtartama magasabb [ADPR] mellett rövidült, de telítési koncentráció mellett is lényegesen hosszabb maradt a flickery záródásokénál (45. D ábra, *bal panel*). Ez arra utal, hogy a burst-öt nem maga a ligandkötődés váltja ki, hanem valamely a kötődést követő konformáció-változás, amely telítési ligand-koncentráció mellett sebesség-meghatározóvá válik (45. E ábra). A TRPM2 kapuzását leíró modell tehát még telítési [ADPR] mellett is minimálisan három-állapot modell kell legyen, amely egy nyitott mellett két elkülöníthető csukott állapotot tartalmaz.. (A 45. C-D ábrákban látható *folytonos piros* illetve *szaggatott kék görbék* az E panelben ábrázolt séma azonos színnel keretezett rész-sémáinak illesztései; a log-likelihood ratio teszt (Csanády, 2006) alapján a C-O modell biztonsággal elvethető.) A felmerülő C-C-O illetve C-O-C alternatívák közül a további analízis (ld. 47. ábra) az utóbbi modellt valószínűsítette ($C_s^*-O^*-C_f^*$; 45. E ábra; a * jelölés ligand-kötött állapotokat, az s és f indexek interburst [slow] illetve flickery [fast] komponenseket jelölnek; a $C_s - C_s^*$ lépés [*vízszintes szaggatott kettős nyíl*] a négy ligand kötését tömöríti magába).

A TRPM2 csatornák rendkívül lassú kapuzása miatt egyetlen aktív csatorna megfigyelése nem szolgáltatott elegendő számú kapuzási eseményt a kapuzás kinetikai paramétereinek megbízható becsléséhez (ld. 45. C, D ábrák, a hisztogramok csak ~70 illetve ~100 eseményt tartalmaznak), ezért a továbbiakban e paraméterek ligand koncentráció-függését olyan, több aktív csatornát tartalmazó, patch regisztrátumokban tanulmányoztuk, amelyekben az egyes kapuzási események tisztán feloldhatók maradtak (46. A és C ábrák). Az ilyen mérések egyes vezetési szintjeinek tartózkodási idő eloszlásait előállítva (46. B és D ábrák; *színes hisztogramok*) ezek együtteséhez, a 10. ábrán bemutatott maximum likelihood algoritmus (Csanády, 2000) segítségével, illeszteni tudtuk a $C_s^*-O^*-C_f^*$ modellt (46. B és D ábrák; *fekete görbecsaládok*). Az így kapott sebességi állandókból a



45. ábra. Egyedi TRPM2 csatornák még telítési ADPR mellett is burst-ös kapuzási mintázatot mutatnak. **A, B,** Egyedi T5L-TRPM2 csatornák áramai 125 μM intracelluláris Ca^{2+} és **(A)** 1 μM illetve **(B)** 32 μM ADPR jelenlétében. A világoskék szaggatott vonalak a nulla-áramsztintet jelzik. **C, D,** Egyedi T5L-TRPM2 csatornák transzformált (Sigworth és Sine, 1987) csukási- *(bal panelek)* illetve nyitási-idő *(jobb panelek)* hisztogramjai 125 μM intracelluláris Ca^{2+} és **(C)** 1 μM illetve **(D)** 32 μM ADPR jelenlétében. A folytonos piros és szaggatott kék görbék az **E** panel hasonló színnel keretezett alsémáinak maximum likelihood illesztései; a C-O-C modell illesztésére kapott log-likelihood növekmény (ΔLL) értéke alapján a C-O modell P szignifikancia szinten elvethető (Csanády, 2006). **E,** A tartózkodási idő eloszlásokkal kompatibilis legegyszerűbb kapuzási séma. A bekeretezett részhalmazok a C-D panelek hasonló színű illesztéseit generálják. A liganddal telített állapotokat csillag jelöli, C_s^* , hosszú (slow) zárt állapot; O^* , nyitott (open) állapot; C_f^* , rövid (flickery) zárt állapot. A vízszintes szaggatott kettős nyíl a ligandmentes (C_s) és telített (C_s^*) hosszú zárt állapotokat köti össze, és összesen 4 ligand megkötését jelöli.



46. ábra. Többcsatornás patch mérések kinetikai elemzése. A, C, Az egyedi kapuzási események tisztán feloldhatók maradnak több aktív TRPM2 csatornát tartalmazó patch-ekben. Steady-state csatorna áramok (**A**) 10 illetve (**C**) 14 aktív T5L TRPM2 csatornát tartalmazó patch-ekben 125 μM Ca^{2+} és (**A**) 32 illetve (**C**) 1 μM ADPR jelenlétében; a csatornák számát mindkét patch esetén a 32 μM ADPR

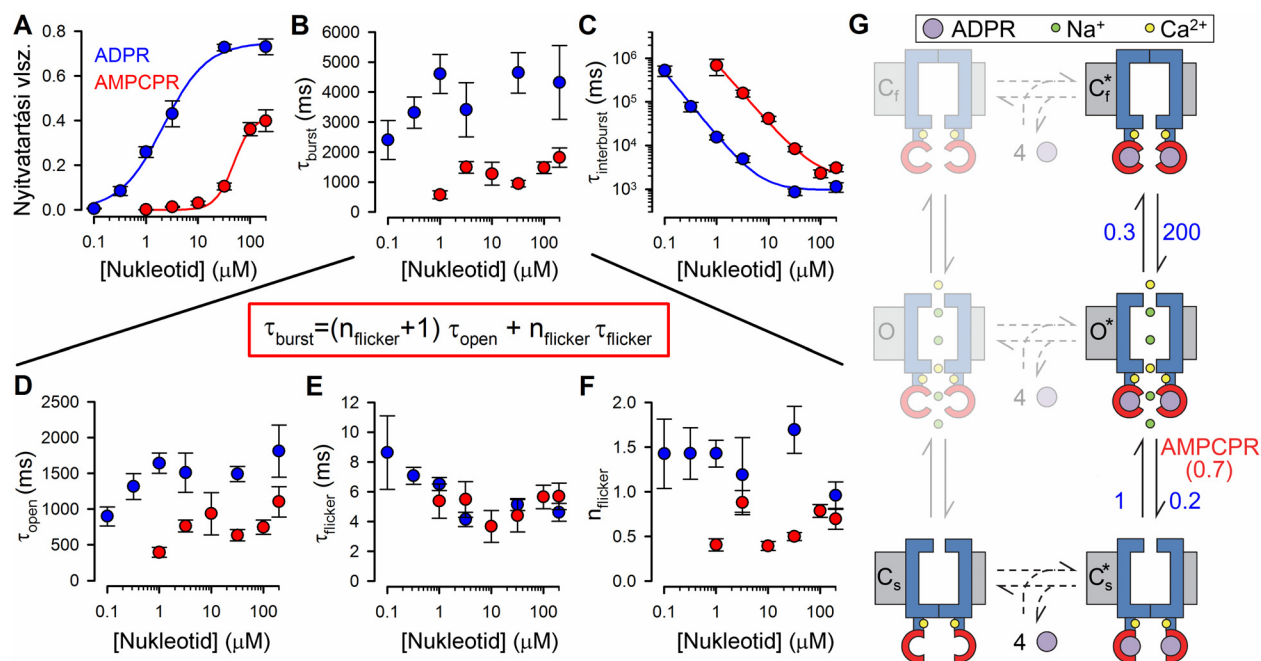
46. ábra (folytatás)... jelenlétében megfigyelhető magas aktivitású szakaszokból becsültük, az egyidejűleg nyitvatartó csatornák maximális száma alapján. A *sárga keretekkel* kiemelt szakaszokat megnyújtott időskálával is ábrázoltuk; megfigyelhető a kapuzási események jó feloldhatósága. Sávszélesség, 200 Hz. **B, D**, Az A és C panelekben ábrázolt csatornaáramok 125 μM Ca^{2+} és (**B**) 32 illetve (**D**) 1 μM ADPR jelenlétében megfigyelt steady-state szakaszainak egyes vezetési szintjeihez (ld., A, C panelek, *szürke szaggatott vonalak*) tartozó logaritmusan transzformált tartózkodási idő eloszlások (*színes hisztogramok*). Az idealizálás holtideje 0.9 ms, a hisztogram együttesek összesen (**B**) 472, illetve (**D**) 1190 eseményt tartalmaznak. A *folytonos fekete görbecsaládok* a $\text{C}_{\text{s}(1)}\text{-O}_{(3)}\text{-C}_{\text{f}(2)}$ séma szimultán maximum likelihood illesztései a hisztogram együttesekhez, a négy sebességi állandóval ($r_{13}, r_{31}, r_{32}, r_{23}$) mint szabad paraméterekkel (Csanády, 2000). A sebességi állandók becslései (**B**) $r_{13}=6.6 \text{ s}^{-1}$, $r_{31}=0.23 \text{ s}^{-1}$, $r_{13}=0.24 \text{ s}^{-1}$, $r_{13}=385 \text{ s}^{-1}$, illetve (**D**) $r_{13}=0.046 \text{ s}^{-1}$, $r_{31}=0.17 \text{ s}^{-1}$, $r_{13}=0.33 \text{ s}^{-1}$, $r_{13}=135 \text{ s}^{-1}$. A számolt burst paraméterek (ld., 47. B-F ábrák) (**B**) $\tau_b=4415 \text{ ms}$, $\tau_{ib}=150 \text{ ms}$, $\tau_o=2145 \text{ ms}$, $\tau_f=2.6 \text{ ms}$, $n_f=1.1$, illetve (**D**) $\tau_b=5082 \text{ ms}$, $\tau_{ib}=21874 \text{ ms}$, $\tau_o=1988 \text{ ms}$, $\tau_f=7.4 \text{ ms}$, $n_f=1.9$.

nyitvatartási valószínűség (P_o) mellett kiszámíthattuk a burst (τ_b), interburst (τ_{ib}), flickery zárt (τ_f), illetve nyitott (τ_o) események átlagos időtartamait, illetve az egy burst-re eső flickery záródások átlagos számát (n_f) is. A fenti paraméterek nukleotid koncentráció-függéseinek részletes vizsgálata (47. A-F ábrák), amelyet mind az ADPR (*kék körök*) mind az AMPCPR (*piros körök*) mint aktiváló ligand jelenlétében elvégeztünk, a következő új megállapításokhoz vezetett (Tóth és mtsai., 2014).

A nukleotid-okozta stimuláció koncentráció-függése (47. A ábra) a csukott csatornák burst-be jutási sebességének ($1/\tau_{ib}$) ligand koncentráció-függését tükrözi (47. C ábra).

Az AMPCPR alacsonyabb hatékonysága (47. A ábra, *piros* vs. *kék körök*; v.ö. 43. C ábra) tehát ezen analógnak a csukott csatornák iránti alacsonyabb kötődési affinitását jelzi (v.ö. 47. G ábra, $\text{C}_s \leftrightarrow \text{C}_s^*$ lépés).

Ezzel szemben a burst-ök átlagos hosszának ligand koncentráció-függése (47. B ábra) csak mérsékelt, bár szignifikáns pozitív korrelációt mutat (pl., az ADPR esetén $r=0.86$). Bár a nyitott (burst) állapotban a csatorna szükségképpen erősebben köti a ligandot mint zárt (interburst) állapotban, e mérsékelt tendencia felveti, hogy a CFTR-rel ellentétben a TRPM2 csatornában a nukleotid ligandok (47. G ábra, *lila*



47. ábra. A nukleotid-függő kapuzás molekuláris mechanizmusa a részletes kinetikai elemzés alapján. **A-F**, 125 μM Ca^{2+} és különböző koncentrációjú ADPR vagy AMPCPR (kék illetve piros körök) jelenlétében kapuzó T5L-TRPM2 csatornák steady-state **(A)** P_o , **(B)** τ_b , **(C)** τ_{ib} , **(D)** τ_o , **(E)** τ_f , illetve **(F)** n_f kapuzási paramétereinek nukleotid koncentráció-függései, 124 többcsatornás patch összesen 199 jól feloldható szegmensének maximum-likelihood illesztéseiből számolva (ld. 4.7. alfejezet, illetve 46. ábra). A τ_b paraméter a **D-F** panelekben ábrázolt "intraburst" paraméterek függvénye (pirosan keretezett egyenlet). A folytonos görbék a Hill egyenletnek (**A** panel, $P_o = P_{o,\infty} \cdot ([L]^n / ([L]^n + K^n))$), illetve a Hill egyenlet inverzének (**C** panel, $\tau_{ib} = ([L]^n + K^n) / ([L]^n \cdot \tau_{ib,\infty})$) illesztései. Az illesztett paraméterek **(A)** az ADPR esetén $P_{o,\infty} = 0.75 \pm 0.03$, $K = 2.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$, $n = 1.0 \pm 0.1$; az AMPCPR esetén $P_{o,\infty} = 0.41 \pm 0.02$, $K = 48 \pm 6 \mu\text{M}$, $n = 2.5 \pm 0.5$; **(C)** az ADPR esetén $\tau_{ib,\infty} = 1.0 \pm 0.2 \text{ s}$, $K = 7.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$, $n = 1.5 \pm 0.1$; az AMPCPR esetén $\tau_{ib,\infty} = 1.8 \pm 0.8 \text{ s}$, $K = 83 \pm 45 \mu\text{M}$, $n = 1.4 \pm 0.1$. **G**, Sematikus rajz, a TRPM2 nukleotid-függő kapuzásának molekuláris értelmezése. A függőleges átmenetek melletti számok sebességi állandók (s^{-1}). Kék, TM domén; felső szűkület, szelektáló filter; alsó szűkület, TM6 helikális köteg; piros, NUDT9H domének; lila, aktiváló nukleotidok; sárga, Ca^{2+} ; zöld, Na^+ . A nukleotid tökéletlen okklúziója lehetővé teszi a nukleotid leválását a burst állapotban is (a halvány színezettel jelzett állapotok irányába).

körök) nyitott állapotban sem teljesen okkludáltak, hanem – ha lassan is – de "kimoshatók" maradnak, azaz létezik "ligandmentes burst" állapot is (47. G ábra, halvány színezettel jelzett O és C_f állapotok). Ennek megfelelően a ligand elvonását követő áramrelaxációk sebességi állandói (v.ö. 44. ábra) a nulla ligand-koncentráció jelenlétében jellemző átlagos burst-hosszat tükrözik. Ezzel szemben korábbi kísérleteink alapján (v.ö. 36. ábra) a ko-aktivátor Ca^{2+} ionok (47. G ábra, *sárga körök*) a csatorna nyitott állapotában is gyors egyensúlyban maradnak a csatornát körülvevő oldattal, azaz "gyorsan kimoshatók".

Az AMPCPR alacsonyabb hatáserősségét (47. A ábra, *piros vs. kék körök*; v.ö. 43. C ábra) az ezen analóg által kiváltott burst-ök csökkent stabilitása, azaz rövidebb élettartama okozza (47. B ábra, *piros vs. kék körök*; v.ö. 44. C ábra).

A $C_s^*-O^*-C_f^*$ modell választását az alternatívaként felmerülő $C_s^*-C_f^*-O^*$ modellel szemben két megfigyelés is alátámasztja. Egyrészt, a rövid, "flickery" záródásoknak mind átlagos hossza (47. E ábra), mind burst-önkénti átlagos gyakorisága (47. F ábra) független a nukleotid koncentrációtól, ami felveti, hogy a nukleotid ligand a "lassú" kaput szabályozza, míg a "flickery" záródásokért felelős gyors kapu ettől független, fizikailag elkülöníthető képlet. (A $C_s^*-C_f^*-O^*$ modell csak egyetlen kaput feltételez, amely a $C_f^*-O^*$ átmenet során nyit/zár.) Másrészt, a $C_s^*-O^*-C_f^*$ modell egyszerűbb magyarázatot kínál az AMPCPR kapuzási kinetikára gyakorolt komplex hatásának magyarázatára. Az ADPR-zal összehasonlítva az AMPCPR kötődése esetén a τ_b (47. B ábra), τ_o (47. D ábra), és n_f (47. F ábra) paraméterek egyaránt csökkennek, míg a τ_f (47. E ábra) paraméter nem változik. A $C_s^*-O^*-C_f^*$ modell értelmében e változások összességét egyetlen kapuzási lépés, az $O^* \rightarrow C_s^*$ átmenet sebességi állandójának ~ 3 -szoros növekedése magyarázza (47. G ábra). Ezzel szemben a $C_s^*-C_f^*-O^*$ modell feltételezése esetén az AMPCPR hatásai csak három sebességi állandó egyidejű megváltozásával lennének magyarázhatók (az $O^* \rightarrow C_f^*$ és $C_f^* \rightarrow C_s^*$ átmenetek gyorsulása mellett a $C_f^* \rightarrow O^*$ átmenetnek lassulnia kellene).

A nukleotidkötő helyek (NUDT9-H domén) intracelluláris elhelyezkedése alapján kézenfekvő, hogy a "lassú kaput" a TM6-os α -hélix-ek (7A ábra) C-terminális, intracelluláris végeinek kötege alkotja, amely a szerkezetileg rokon kation csatornák mindegyikében citoszolikus kapu szerepét tölti be (Long és mtsai., 2005; Liao és mtsai., 2013). Feltételezhetően ugyanezt a kaput (47. G ábra, *alsó kapu*)

szabályozzák a szintén intracelluláris kötőhellyel rendelkező ko-aktivátor Ca^{2+} ionok (ld. 37. B ábra), valamint a membrán belső rétegében elhelyezkedő PIP_2 molekulák is (v.ö., (Hansen és mtsai., 2011)). Ezzel szemben felmerül, hogy a rövid, flickery záródások az extracelluláris oldalon elhelyezkedő szelektáló filter apró, lokális konformáció-változásait tükrözik (47. G ábra, *felső kapu*).

6. SZINTÉZIS: A CFTR ÉS TRPM2 CSATORNA-ENZIMEK ÖSSZEVETÉSE

Bár a CFTR és a TRPM2 csatornák fehérje szekvenciái között nem mutatható ki hasonlóság, kapuzási mechanizmusaik között mégis számos érdekes párhuzam fedezhető fel.

6.1. Többsíkú szabályozás

Mindkét csatorna kapuzása több tényező együttes fennállását feltételezi: a CFTR csatornák csak az R domén foszforilációja és intracelluláris ATP jelenléte esetén aktívak (3. C ábra), míg a TRPM2 csatornák aktivitásához intracelluláris Ca^{2+} és ADPR (35. A ábra), valamint a membrán megfelelő PIP_2 tartalma (40. ábra) is szükséges. Fiziológias körülmények között azonban a csatornák szabályozásában e tényezők nem egyforma mértékben játszanak szerepet. A CFTR ATP iránti érzékenysége ($K_{1/2} \sim 50 \mu\text{M}$; (Csanády és mtsai., 2000)) például sokkal magasabb annál, mintsemhogy az ATP mind szabályozó tényező szóba jöhetne: az élő sejt citoplazmájára jellemző magas (mM-os) ATP koncentráció mellett a CFTR csatornák NBD doménjei valószínűleg folyamatosan telítve vannak ATP-vel. Ezért a CFTR aktivitását élő sejtben elsősorban a foszforiláció mértéke határozza meg. Köznapi hasonlattal élve az ATP az "üzemanyag" amely a kapuzás "motorját" (az NBD dimerizációs-disszociációs ciklust) hajtja, míg a foszforiláció/defoszforiláció a "gázpedál", amely e folyamat sebességét az aktuális élettani követelményekhez igazodva szabályozza. A TRPM2 csatornát is koincidencia detektornak tekintik amely az intracelluláris [ADPR] és [Ca^{2+}] együttes emelkedését jelzi. Azonban eredményeink alapján e két ligand hatásának teljesen eltérő a dinamikája: fiziológias körülmények között (intakt sejtben, magas extracelluláris [Ca^{2+}] mellett) a Ca^{2+} -ra permeábilis TRPM2 saját aktivitása révén regenerálja egyik aktiváló ligandját (az intracelluláris Ca^{2+} -ot), amely nyitott pórus jelenlétében az aktiváló kötőhelyek közvetlen közelében mikromoláros koncentráció tartományba emelkedik, és telítésben tartja e kötőhelyeket (37. ábra). Intracelluláris ADPR jelenlétében tehát valószínűleg egyetlen rövid Ca^{2+} szignál is elegendő ahhoz, hogy elnyújtott, önfenntartó TRPM2 aktivitást váltson ki, amelynek csak a citoszolikus ADPR koncentrációja szab határt. Hasonlóképpen, a TRPM2 PIP_2 iránti nagy affinitása

(v.ö. 40. ábra) fényében kérdéses, hogy élettani körülmények között elfordul-e a membrán PIP_2 tartalmának olyan mértékű csökkenése, amely már korlátozná a TRPM2 aktivitását.

6.2. Katalízis és kapuzás kapcsoltsága

A számunkra legizgalmasabbnak ígérkező párhuzam a CFTR és a TRPM2 csatornák között a két csatorna enzimatis aktivitása volt. Mindkét csatornáról leírták, hogy elhasítja aktiváló nukleotid ligandját: a CFTR-t aktiváló ATP-t a két NBD domén által közösen alkotott "2-es kötőhely" (4. B ábra; v.ö. (Ramjeesingh és mtsai., 1999)), a TRPM2-t aktiváló ADPR-t pedig a NUDT9-H domén (7. A ábra; (Perraud és mtsai., 2001)) bontja el. Fiziológias koncentráció viszonyok között mindkét kémiai folyamat erősen exergonikus, ezért az ezeket katalizáló enzimek mechanizmusa mindenképpen nem-egyensúlyi, közel irreverzibilis, ciklusos folyamat kell legyen. Ezzel szemben, maga az ioncsatornákon keresztüli transzport termodinamikailag passzív folyamat, aminek megfelelően a csatornák többségének kapuzása nem igényel energiabefektetést, hanem egyszerű egyensúlyi mechanizmust követ. Ezért munkánk kezdetén erősen vitatott volt, hogy a CFTR és a TRPM2 csatornák esetében mennyire lehet szoros a kapcsoltság a kapuzás és az enzimatis ciklus között. Munkánk egyik alapvető célkitűzése e kérdés tisztázása volt mindkét tanulmányozott csatorna esetében.

A WT CFTR csatorna esetében eredményeink alátámasztották azt a feltételezést, hogy a pórus kapuzásának folyamata szorosan csatolódik az NBD doméneken zajló ATP hidrolízis ciklushoz, azaz maga is ciklikus, nem-egyensúlyi folyamat (6. ábra). Ez az ioncsatornák világában szokatlan mechanizmus a CFTR evolúciós eredetéből adódik, hiszen e csatorna feltehetőleg valamely ősi ABC transzporter leszármazottja. Az egyensúlytól távoli működés pedig az egyirányú "uphill" transzportot katalizáló ABC exporterek esetén szükségszerű tulajdonság: e transzporterekben az ATP hidrolízis energiája olyan ciklust hajt, amelynek során a TMD-ok befelé nyitott nagyaffinitású és kifelé nyitott kisaffinitású konformációk között váltakoznak, lehetővé téve a szubsztrát megkötését az alacsony koncentrációjú intracelluláris kompartmentben, majd annak eleresztését a magasabb koncentrációjú extracelluláris kompartmentben (5. ábra). A CFTR ciklikus mechanizmusát két alapvető megfigyelésünk bizonyítja. (i) Egyrészt, az egyedi WT CFTR csatornák

nyitási idő eloszlásainak egyértelműen csúcsos volta (19. F ábra) kizárja az egyensúlyi kapuzás lehetőségét. Ezen eloszlások maximum likelihood illesztése alapján a nyitási események döntő többsége (>95%-a) esetén a záródás folyamata nem a nyitási reakció megfordítása, hanem kinetikailag elkülöníthető reakcióút mentén halad (Csanády és mtsai., 2010). E normális záródási reakció pedig ATP hidrolízisen keresztül kell hogy megvalósuljon, hiszen a záródás sebessége a hidrolízis megakadályozása esetén kb. 1/100-adára csökken: mind a 2-es kötőhely kulcspozícióinak mutációi (pl. K1250A, E1371S/Q mutációk [pl. 28. ábra]), mind nem-hidrolizálható ATP analógok (pl. AMPPNP, pirofoszfát [17. A-B ábrák]) kötődése a 2-es kötőhelyhez "nyitva rekesztik" a CFTR csatornákat (v.ö., (Gadsby és mtsai., 2006)). (ii) A CFTR kapuzás ciklusos jellegét bizonyító másik, független megfigyelésünk az NPPB kapuzásra gyakorolt komplex hatása. Ez a drog egyrészt stabilizálja a nyitási reakció aktivált állapotát, így katalitikusan inaktív CFTR mutánsoknak mind a nyitási, mind a (rendkívül lassú) záródási sebességét egyforma mértékben növeli (v.ö. 27. B ábra). Ezzel szemben WT CFTR csatornák esetén az NPPB szintén növeli a nyitási sebességet, azonban a záródási sebességet paradox módon csökkenti (27. A ábra). Ez a tény megint azt bizonyítja, hogy a WT csatornák záródása a nyitási reakciótól független reakcióút mentén valósul meg (Csanády és Torocsik, 2014a).

Bár a TRPM2 csatornáról is leírták, hogy elhasítja aktiváló ligandját, az ADPR-t (Perraud és mtsai., 2001; Perraud és mtsai., 2003), sokoldalú megközelítéssel bizonyítottuk, hogy a pórus kapuzása nincs ezen enzimatisz aktivitáshoz csatolva, azaz a WT TRPM2 csatorna kapuzása egyensúlyi folyamat. Egyrészt, a TRPM2 NUDT9-H doménjének konzervált – az ADPRáz enzimek katalízis szempontjából kulcsfontosságú – "Nudix-box" pozícióba bevitt számos mutáció egyike sem fejtett ki számottevő hatást a csatorna kapuzására (41. ábra). Másrészt, a nem-hidrolizálható ADPR analóg AMPCPR (42. ábra) alkalmasnak bizonyult a csatorna aktiválására (43. B ábra), és alkalmazásakor sem a csatornák "nyitva rekedése", sem "csukva rekedése" nem volt tapasztalható. Ellenkezőleg, miközben a telítési [AMPCPR] mellett mért maximális nyitási sebesség megközelítette az ADPR indukálta maximális nyitási sebességet (47. C ábra), az AMPCPR indukálta kapuzás csukódási sebessége kb. 3-szor gyorsabb volt az ADPR mellett mérhető kontrollhoz képest (44. C és 47. B ábrák). E megfigyelések egyértelműen bizonyítják, hogy a WT TRPM2 csatornák egyetlen kapuzási lépése

sem kötődik az ADPR hidrolíziséhez (Tóth és mtsai., 2014). A TRPM2 irodalomban közölt ADPRáz aktivitásának (Perraud és mtsai., 2001; Perraud és mtsai., 2003) valóságos voltát további biokémiai vizsgálatoknak kell megerősítenie vagy cáfolnia. Bár genomiális analízis alapján a TRPM2 csatornáéhoz hasonló, Nudix-doménnal fuzionált csatorna(szerű) fehérje szekvenciák már az ősi egysejtű protisztákban is megjelentek (Schnitzler és mtsai., 2008), ezek funkciójáról, illetve Nudix-doménjeik aktivitásáról egyelőre semmit sem tudunk. Így a NUDT9-H domén esetleges enzimatis aktivitásának evolúciós eredete jelenleg ismeretlen.

6.3. Az aktivitás befolyásolásának alapvető farmakológiai stratégiái

A kapuzás egyensúlyi vagy nem-egyensúlyi volta alapvetően meghatározza a csatorna modulátorok fejlesztésének stratégiáját. A TRPM2 kapuzása egyensúlyi folyamat (Tóth és mtsai., 2014), így ennek befolyásolására elsősorban a klasszikus, a droghely affinitásváltozásán alapuló mechanizmus látszik alkalmasnak: a nyitott állapotban erősebben kötődő drogok a nyitott csatornát, a csukott állapotban erősebben kötődők pedig a csukott csatornát fogják energetikailag stabilizálni – az előbbiek aktiváló, az utóbbiak gátló hatásúak lesznek. Az átmeneti állapotok energetikai befolyásolása csak a kapuzás kinetikájára hathat: egyforma mértékben változtatja meg a nyitási és a csukódási sebességet, a nyitvatartási valószínűséget viszont nem befolyásolhatja (29. A-C ábrák). Ezzel szemben a CFTR irreverzibilis, ciklikus kapuzási mechanizmusa egyedi beavatkozási lehetőségeket kínál: miután a csatorna nyitási és csukódási reakciója két külön energiagáton keresztül valósul meg (29. B ábra), ezen energiagátak befolyásolása révén a nyitási és a csukódási sebesség szelektíven manipulálható, ami a nyitvatartási valószínűség változását eredményezi. Jó példa erre az általunk vizsgált két CFTR aktivátor, a 3NB, amely szelektíven növeli a nyitási sebességet (33. ábra, *kék*), valamint a 3PP, amely szelektíven csökkenti a záródási sebességet (33. ábra, *piros*) a WT CFTR csatornán (Csanády és Torocsik, 2014b). E két drogmolekula fúzióját megtestesítő NPPB esetében pedig mindkét hatás együttes érvényesülése (33. ábra, *barna*) különösen nagy hatásereőségű CFTR stimulátort eredményez (Csanády és Torocsik, 2014a). A fentiek értelmében persze nem meglepő, hogy a drogok a katalitikusan inaktív CFTR mutánsoknak csak kapuzási kinetikájára hatnak, nyitvatartási valószínűségüket azonban nem befolyásolják.

7. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

7.1. 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 az egyik legnagyobb hatásereőségű CFTR stimulátor. A stimuláció két kinetikailag elkülöníthető hatás – a nyitási lépés energiagátjának csökkentése és az ATP-hasítási lépés gátlása – révén valósul meg. E két hatás alacsony alapaktivitás esetén (pl. a cisztikus fibrózist okozó $\Delta F508$ mutáns) együttesen akár 10-15-szörös stimulációt is okoz. 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. A kapuzás stimulációjának ezen formája, amely kizárólag energiagátak befolyásolásán alapul, teljesen egyedi, és csak nem-egyensúlyi, ciklikus kapuzási mechanizmus esetén vezethet a nyitvatartási valószínűség növekedéséhez.

7.2. A TRPM2 szerkezete és működése

A TRPM2 csatorna egymástól független gyors és lassú kapuval rendelkezik. Az intracelluláris ADPR, az intracelluláris Ca^{2+} , és a membrán belső rétegében található PIP_2 a TRPM2 ko-aktivátorai, amelyek a csatorna intracelluláris lassú kapuját szabályozzák. A négy alegységhez kötődő Ca^{2+} ionok a Monod-Wyman-Changeux mechanizmussal aktiválják a csatornát, összességében $>10^6$ -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. Fiziológias 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.

7.3. Elméleti eredmények

Kapuzási kinetikai paraméterek több csatornát tartalmazó patch regisztrátumokból is hatékonyan kinyerhetők a maximum likelihood módszerrel. A loglikelihood ratio teszt segítségével alternatív kinetikai modellek statisztikailag objektív módon rangsorolhatók.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönöm szüleimnek és a Piarista Gimnázium tanárainak a modern természettudományos világszemlélettel ötvözött keresztény világnézetet, és a valóság megismerésének vágyát amit belém oltottak. Külön köszönöm édesapámnak az idegen nyelvek tanulásának támogatását, amelyeken keresztül megnyílt előttem a világ.

Köszönettel tartozom egyetemi oktatóimnak akik a Semmelweis Orvostudományi Egyetemen a biológiai tudományok, az Eötvös Loránd Tudományegyetemen pedig a matematikai tudományok alapjaival ismertettek meg. Köszönöm Roska Botondnak a tudományért való lelkesedés megosztását az egyetemi évek alatt.

Külön köszönettel tartozom David C. Gadsby professzornak, aki a Rockefeller Egyetemen PhD mentoromként kutatói és emberi mintát adott. Köszönöm neki továbbá a hazatérésem óta is fennálló töretlen támogatását, amely közös pályázatok által támogatott tudományos együttműködésben, folyamatos párbeszédben, valamint számos közleményünk szakmai és nyelvi lektorálásában mutatkozott meg.

Köszönöm Kim W. Chan kollégámnak a Gadsby laborban eltöltött évek során közösen végzett tudományos munkánk örömét, Bruce Knight professzornak pedig kitartó mentorálását, amellyel matematikai ismereteimett elmélyítette.

Köszönöm Ádám Veronika professzor asszonynak, hogy hazatérésem után a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetébe befogadott, köszönöm, hogy mindig biztosította a munkámhoz szükséges technikai feltételeket, de emellett a számomra oly fontos szakmai függetlenséget is. Köszönöm Tretter László professzornak, intézetünk jelenlegi igazgatójának is baráti támogatását.

Köszönettel tartozom Szöllősi András, Tóth Balázs, Törőcsik Beáta, és Mihályi Csaba munkatársaimnak az itt bemutatott tudományos munkákban való aktív részvételükért, és Mayer Dorottyának a sok éven keresztül végzett technikai segítségért. Köszönöm továbbá az intézet összes munkatársainak emberi és szakmai támogatásukat.

Köszönet illeti Paola Vergani kollaborátorunkat a hosszú évek óta tartó tudományos együttműködésért. Szintén köszönöm Sarkadi Balázsnak és Váradi Andrásnak a munkacsoportjaink között folyamatosan fennálló kapcsolatot,

különösen Szakács Gergelynek, Homolya Lászlónak, és Szeri Flórának a sok gondolatébresztő párbeszédet.

Munkánkat számos pályázat és ösztöndíj támogatta, amelyekért köszönet illeti az adományozó intézményeket, a National Institute of Health-et, a Wellcome Trust-ot, az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok-at, a Howard Hughes Medical Institute-ot, valamint a Magyar Tudományos Akadémiát.

Végezetül köszönöm feleségemnek és gyermekeimnek szeretetüket, amellyel körülvesznek.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Aleksandrov, A.A., X. Chang, L. Aleksandrov, and J.R. Riordan. 2000. The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol* 528 Pt 2:259-265.
- Aleksandrov, A.A., L. Cui, and J.R. Riordan. 2009. Relationship between nucleotide binding and ion channel gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Physiol* 587:2875-2886.
- Aleksandrov, A.A. and J.R. Riordan. 1998. Regulation of CFTR ion channel gating by MgATP. *FEBS Lett* 431:97-101.
- Aleksandrov, L., A.A. Aleksandrov, X.B. Chang, and J.R. Riordan. 2002. The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J Biol Chem* 277:15419-15425.
- Aller, S.G., J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R.P. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q.H. Zhang, I.L. Urbatsch, and G. Chang. 2009. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 323:1718-1722.
- Artigas, P. and D.C. Gadsby. 2003. Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:501-505.
- Auerbach, A. 2007. How to turn the reaction coordinate into time. *J Gen Physiol* 130:543-546.
- Bai, Y.H., M. Li, and T.C. Hwang. 2010. Dual roles of the sixth transmembrane segment of the CFTR chloride channel in gating and permeation. *J Gen Physiol* 136:293-309.
- Bai, Y.H., M. Li, and T.C. Hwang. 2011. Structural basis for the channel function of a degraded ABC transporter, CFTR (ABCC7). *J Gen Physiol* 138:495-507.
- Basso, C., P. Vergani, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2003. Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH₂-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J Gen Physiol* 122:333-348.

- Beauge, L.A., R.H. Cook, I.M. Glynn, and W. Smith. 1979. A rapid ion-exchange technique used to detect the occlusion of ions within the sodium pump. *J Physiol* 295:4p.
- Beck, A., M. Kolisek, L.A. Bagley, A. Fleig, and R. Penner. 2006. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes. *FASEB J*.
- Chakrapani, S. and A. Auerbach. 2005. A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:87-92.
- Chan, K.W., L. Csanády, D. Seto-Young, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 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.
- Chen, J., G. Lu, J. Lin, A.L. Davidson, and F.A. Quiocho. 2003. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* 12:651-661.
- Cheng, S.H., R.J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D.W. Souza, G.A. White, C.R. Oriordan, and A.E. Smith. 1990. Defective Intracellular-Transport and Processing of Cftr Is the Molecular-Basis of Most Cystic-Fibrosis. *Cell* 63:827-834.
- Cheng, S.H., D.P. Rich, J. Marshall, R.J. Gregory, M.J. Welsh, and A.E. Smith. 1991. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66:1027-1036.
- Csanády, L. 2000. Rapid kinetic analysis of multichannel records by a simultaneous fit to all dwell-time histograms. *Biophys J* 78:785-799.
- Csanády, L. 2006. Statistical evaluation of ion-channel gating models based on distributions of LogLikelihood Ratios. *Biophys J* 90:3523-3545.
- Csanády, L. 2009. Application of rate-equilibrium free energy relationship analysis to nonequilibrium ion channel gating mechanisms. *J Gen Physiol* 134:129-136.
- Csanády, L., K.W. Chan, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2005a. Functional roles of nonconserved structural segments in CFTR's NH₂-terminal nucleotide binding domain. *J Gen Physiol* 125:43-55.

- Csanády, L., K.W. Chan, D. Seto-Young, D.C. Kopsco, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2000. Severed channels probe regulation of gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by its cytoplasmic domains. *J Gen Physiol* 116:477-500.
- Csanády, L. and J.A. Mindell. 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.
- Csanády, L., A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2006. Thermodynamics of CFTR channel gating: a spreading conformational change initiates an irreversible gating cycle. *J Gen Physiol* 128:523-533.
- Csanády, L., D. Seto-Young, K.W. Chan, C. Cenciarelli, B.B. Angel, J. Qin, D.T. McLachlin, A.N. Krutchinsky, B.T. Chait, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2005b. Preferential phosphorylation of R-domain Serine 768 dampens activation of CFTR channels by PKA. *J Gen Physiol* 125:171-186.
- Csanády, L. and B. Torocsik. 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.
- Csanády, L. and B. Torocsik. 2014a. Catalyst-like modulation of transition states for CFTR channel opening and closing: New stimulation strategy exploits nonequilibrium gating. *J Gen Physiol* 143:269-287.
- Csanády, L. and B. Torocsik. 2014b. Structure-activity analysis of a CFTR channel potentiator: Distinct molecular parts underlie dual gating effects. *J Gen Physiol* 144:321-336.
- Csanády, L., P. Vergani, and D.C. Gadsby. 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 U S A* 107:1241-1246.
- Cuello, L.G., V. Jogini, D.M. Cortes, and E. Perozo. 2010. Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature* 466:203-U73.
- Cui, G.Y., B.L. Song, H.W. Turki, and N.A. McCarty. 2012. Differential contribution of TM6 and TM12 to the pore of CFTR identified by three sulfonylurea-based blockers. *Pflug Arch Eur J Phy* 463:405-418.

- Dawson, R.J.P. and K.P. Locher. 2006. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443:180-185.
- Fersht, A. 2002. Structure and Mechanism in protein science. 4 ed. W.H.Freeman and Company, New York.
- Fonfria, E., I.C. Marshall, I. Boyfield, S.D. Skaper, J.P. Hughes, D.E. Owen, W. Zhang, B.A. Miller, C.D. Benham, and S. McNulty. 2005. Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem* 95:715-723.
- Gadsby, D.C. 2009. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:344-352.
- Gadsby, D.C., P. Vergani, and L. Csanády. 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440:477-483.
- Gao, X., Y. Bai, and T.C. Hwang. 2013. Cysteine Scanning of CFTR's First Transmembrane Segment Reveals Its Plausible Roles in Gating and Permeation. *Biophys J* 104:786-797.
- Ge, N., C.N. Muise, X.D. Gong, and P. Linsdell. 2004. Direct comparison of the functional roles played by different transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Biol Chem* 279:55283-55289.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Gunderson, K.L. and R.R. Kopito. 1994. Effects of pyrophosphate and nucleotide analogs suggest a role for ATP hydrolysis in cystic fibrosis transmembrane regulator channel gating. *J Biol Chem* 269:19349-19353.
- Gunderson, K.L. and R.R. Kopito. 1995. Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role ATP binding and hydrolysis. *Cell* 82:231-239.
- Hallows, K.R., V. Raghuram, B.E. Kemp, L.A. Witters, and J.K. Foskett. 2000. Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest* 105:1711-1721.

- Hansen, S.B., X. Tao, and R. MacKinnon. 2011. Structural basis of PIP(2) activation of the classical inward rectifier K(+) channel Kir2.2. *Nature* 477:495-U152.
- Hara, Y., M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudoh, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto, and Y. Mori. 2002. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9:163-173.
- Hermosura, M.C., A.M. Cui, R.C. Go, B. Davenport, C.M. Shetler, J.W. Heizer, C. Schmitz, G. Mocz, R.M. Garruto, and A.L. Perraud. 2008. Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18029-18034.
- Hohl, M., C. Briand, M.G. Grutter, and M.A. Seeger. 2012. Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol* 19:395-402.
- Hollenstein, K., R.J. Dawson, and K.P. Locher. 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* 17:412-418.
- Hopfner, K.P., A. Karcher, D.S. Shin, L. Craig, L.M. Arthur, J.P. Carney, and J.A. Tainer. 2000. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101:789-800.
- Huang, C.L., S.Y. Feng, and D.W. Hilgemann. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by G beta gamma. *Nature* 391:803-806.
- Hung, L.W., I.X. Wang, K. Nikaido, P.Q. Liu, G.F. Ames, and S.H. Kim. 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396:703-707.
- Hwang, T.C., G. Nagel, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 1994. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator C1 channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4698-4702.
- Jackson, M.B. 1986. Kinetics of unliganded acetylcholine receptor channel gating. *Biophys J* 49:663-672.

- Jackson, M.B., B.S. Wong, C.E. Morris, H. Lecar, and C.N. Christian. 1983. Successive openings of the same acetylcholine receptor channel are correlated in open time. *Biophys J* 42:109-114.
- Jardetzky, O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211:969-970.
- Jih, K.Y., Y. Sohma, and T.C. Hwang. 2012. Nonintegral stoichiometry in CFTR gating revealed by a pore-lining mutation. *J Gen Physiol* 140:347-359.
- Kijima, S. and H. Kijima. 1987. Statistical analysis of channel current from a membrane patch. I. Some stochastic properties of ion channels or molecular systems in equilibrium. *J Theor Biol* 128:423-434.
- Kolisek, M., A. Beck, A. Fleig, and R. Penner. 2005. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 18:61-69.
- Lewis, H.A., S.G. Buchanan, S.K. Burley, K. Connors, M. Dickey, M. Dorwart, R. Fowler, X. Gao, W.B. Guggino, W.A. Hendrickson, J.F. Hunt, M.C. Kearins, D. Lorimer, P.C. Maloney, K.W. Post, K.R. Rajashankar, M.E. Rutter, J.M. Sauder, S. Shriver, P.H. Thibodeau, P.J. Thomas, M. Zhang, X. Zhao, and S. Emtage. 2004. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* 23:282-293.
- Li, C., M. Ramjeesingh, W. Wang, E. Garami, M. Hewryk, D. Lee, J.M. Rommens, K. Galley, and C.E. Bear. 1996. ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 271:28463-28468.
- Liao, M.F., E.H. Cao, D. Julius, and Y.F. Cheng. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504:107-+.
- Linsdell, P. 2005. Location of a common inhibitor binding site in the cytoplasmic vestibule of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Biol Chem* 280:8945-8950.
- Lisal, J. and M. Maduke. 2008. The CIC-0 chloride channel is a 'broken' Cl(-)/H(+) antiporter. *Nat Struct Mol Biol* 15:805-810.

- Long, S.B., E.B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309:897-903.
- Mathews, C.J., J.A. Tabcharani, X.B. Chang, T.J. Jensen, J.R. Riordan, and J.W. Hanrahan. 1998. Dibasic protein kinase A sites regulate bursting rate and nucleotide sensitivity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Physiol* 508 (Pt 2):365-377.
- McHugh, D., R. Flemming, S.Z. Xu, A.L. Perraud, and D.J. Beech. 2003. Critical intracellular Ca²⁺ dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J Biol Chem* 278:11002-11006.
- McQuillin, A., N.J. Bass, G. Kalsi, J. Lawrence, V. Puri, K. Choudhury, S.D. Detera-Wadleigh, D. Curtis, and H.M. Gurling. 2006. Fine mapping of a susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region containing the C21ORF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3. *Mol Psychiatry* 11:134-142.
- Miki, H., Z. Zhou, M. Li, T.C. Hwang, and S.G. Bompadre. 2010. Potentiation of Disease-associated Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutants by Hydrolyzable ATP Analogs. *J Biol Chem* 285:19967-19975.
- Miller, C. 2006. CIC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* 440:484-489.
- Miller, C. 2010. CFTR: Break a pump, make a channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:959-960.
- Moody, J.E., L. Millen, D. Binns, J.F. Hunt, and P.J. Thomas. 2002. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* 277:21111-21114.
- Morais-Cabral, J.H., Y.F. Zhou, and R. MacKinnon. 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414:37-42.
- Mornon, J.P., P. Lehn, and I. Callebaut. 2008. Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: Membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell Mol Life Sci* 65:2594-2612.

- Nagamine, K., J. Kudoh, S. Minoshima, K. Kawasaki, S. Asakawa, F. Ito, and N. Shimizu. 1998. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 54:124-131.
- Nilius, B., G. Owsianik, T. Voets, and J.A. Peters. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165-217.
- O'Sullivan, B.P. and S.D. Freedman. 2009. Cystic fibrosis. *Lancet* 373:1891-1904.
- Ostedgaard, L.S., O. Baldursson, D.W. Vermeer, M.J. Welsh, and A.D. Robertson. 2000. A functional R domain from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is predominantly unstructured in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5657-5662.
- Perraud, A.L., A. Fleig, C.A. Dunn, L.A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A.J. Stokes, Q. Zhu, M.J. Bessman, R. Penner, J.P. Kinet, and A.M. Scharenberg. 2001. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411:595-599.
- Perraud, A.L., B. Shen, C.A. Dunn, K. Rippe, M.K. Smith, M.J. Bessman, B.L. Stoddard, and A.M. Scharenberg. 2003. NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem* 278:1794-1801.
- Perraud, A.L., C.L. Takanishi, B. Shen, S. Kang, M.K. Smith, C. Schmitz, H.M. Knowles, D. Ferraris, W. Li, J. Zhang, B.L. Stoddard, and A.M. Scharenberg. 2005. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 280:6138-6148.
- Picciotto, M.R., J.A. Cohn, G. Bertuzzi, P. Greengard, and A.C. Nairn. 1992. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 267:12742-12752.
- Pilewski, J.M. and R.A. Frizzell. 1999. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 79:S215-S255.
- Post, R.L., C. Hegyvary, and S. Kume. 1972. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 247:6530-6540.

- Qian, F., Y. El Hiani, and P. Linsdell. 2011. Functional arrangement of the 12th transmembrane region in the CFTR chloride channel pore based on functional investigation of a cysteine-less CFTR variant. *Pflugers Arch* 462:559-571.
- Ramjeesingh, M., C. Li, E. Garami, L.J. Huan, K. Galley, Y. Wang, and C.E. Bear. 1999. Walker mutations reveal loose relationship between catalytic and channel-gating activities of purified CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). *Biochemistry* 38:1463-1468.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073.
- Rohacs, T. and B. Nilius. 2007. Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch* 455:157-168.
- Sano, Y., K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yokoi, H. Matsushime, and K. Furuichi. 2001. Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science* 293:1327-1330.
- Schnitzler, M., J. Waring, T. Gudermann, and V. Chubanov. 2008. Evolutionary determinants of divergent calcium selectivity of TRPM channels. *FASEB J* 22:1540-1551.
- Scott-Ward, T.S., Z. Cai, E.S. Dawson, A. Doherty, A.C. Da Paula, H. Davidson, D.J. Porteous, B.J. Wainwright, M.D. Amaral, D.N. Sheppard, and A.C. Boyd. 2007. Chimeric constructs endow the human CFTR Cl^- channel with the gating behavior of murine CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16365-16370.
- Shen, B.W., A.L. Perraud, A. Scharenberg, and B.L. Stoddard. 2003. The crystal structure and mutational analysis of human NUDT9. *J Mol Biol* 332:385-398.
- Sigworth, F.J. and S.M. Sine. 1987. Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J* 52:1047-1054.
- Smith, P.C., N. Karpowich, L. Millen, J.E. Moody, J. Rosen, P.J. Thomas, and J.F. Hunt. 2002. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10:139-149.

- Sonawane, N.D., D. Zhao, O. Zegarra-Moran, L.J.V. Galletta, and A.S. Verkman. 2008. Nanomolar CFTR inhibition by pore-occluding divalent polyethylene glycol-malonic acid hydrazides. *Chem Biol* 15:718-728.
- Starkus, J., A. Beck, A. Fleig, and R. Penner. 2007. Regulation of TRPM2 by extra- and intracellular calcium. *J Gen Physiol* 130:427-440.
- Thiagarajah, J.R. and A.S. Verkman. 2005. New drug targets for cholera therapy. *Trends Pharmacol Sci* 26:172-175.
- Tóth, B. and L. Csanády. 2010. Identification of direct and indirect effectors of the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel. *J Biol Chem* 285:30091-30102.
- Tóth, B. and L. Csanády. 2012. Pore collapse underlies irreversible inactivation of TRPM2 cation channel currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13440-13445.
- Tóth, B., I. Iordanov, and L. Csanády. 2014. Putative chanzyme activity of TRPM2 cation channel is unrelated to pore gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:16949-16954.
- Tsuruda, P.R., D. Julius, and D.L. Minor, Jr. 2006. Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* 51:201-212.
- Uchida, K., K. Dezaki, B. Damdindorj, H. Inada, T. Shiuchi, Y. Mori, T. Yada, Y. Minokoshi, and M. Tominaga. 2011. Lack of TRPM2 Impaired Insulin Secretion and Glucose Metabolisms in Mice. *Diabetes* 60:119-126.
- Vedovato, N. and D.C. Gadsby. 2014. Route, mechanism, and implications of proton import during Na⁺/K⁺ exchange by native Na⁺/K⁺-ATPase pumps. *J Gen Physiol* 143:449-464.
- Vergani, P., S.W. Lockless, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2005. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433:876-880.
- Vergani, P., A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2003. On the mechanism of MgATP-dependent gating of CFTR Cl⁻ channels. *J Gen Physiol* 121:17-36.

- Wang, W., G. Li, J.P. Clancy, and K.L. Kirk. 2005. Activating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels with pore blocker analogs. *J Biol Chem* 280:23622-23630.
- Ward, A., C.L. Reyes, J. Yu, C.B. Roth, and G. Chang. 2007. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19005-19010.
- Wilkinson, D.J., T.V. Strong, M.K. Mansoura, D.L. Wood, S.S. Smith, F.S. Collins, and D.C. Dawson. 1997. CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Am J Physiol* 273:L127-L133.
- Yamamoto, S., S. Shimizu, S. Kiyonaka, N. Takahashi, T. Wajima, Y. Hara, T. Negoro, T. Hiroi, Y. Kiuchi, T. Okada, S. Kaneko, I. Lange, A. Fleig, R. Penner, M. Nishi, H. Takeshima, and Y. Mori. 2008. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med* 14:738-747.
- Zerangue, N. and M.P. Kavanaugh. 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383:634-637.
- Zhou, J.J., M.S. Li, J.S. Qi, and P. Linsdell. 2010. Regulation of conductance by the number of fixed positive charges in the intracellular vestibule of the CFTR chloride channel pore. *J Gen Physiol* 135:229-245.

10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

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

10.1. Az értekezés alapját képező idegen nyelvű közlemények

- *1. Tóth, B., Iordanov, I., **Csanády, L.** 2014. Putative channel activity of TRPM2 cation channel is unrelated to pore gating. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***. 111:16949-16954. IF(2013): 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(2013): 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(2013): 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.

10.2. 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. Ca^{2+} - and voltage-dependent gating of Ca^{2+} - 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

10.3. Magyar nyelvű közlemények: –

10.4. 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.

10.5. Tudománymetriai 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
Társszerzős közlemények száma:	5
PhD óta megjelent közlemények száma:	27