

## Válaszok Dr. Panyi György Professzor kérdéseire

Először is köszönöm Panyi Professzor Úrnak a rendkívül részletes, szakmailag alapos bírálatot és a pozitív értékelést. A feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

**1. Az inside-out patch konfigurációban elvégzett mérések esetén tapasztalataim szerint állandóan felmerülő probléma, hogy a pipetába behúzott membrán ún. omega alakzatot vehet fel, ami megnehezíti a csatorna citoszolikus bejáratánál az oldatok gyors és pontos cseréjét. Ez különösen érdekes lehet ott ahol a  $\text{Ca}^{2+}$  elvonás után az áram megszűnésének igen gyors (~ms) kinetikáját méri. A patch geometria miatt az oldatcsere akkor is nagyon lassú lehet, ha egyébként a gyors perfúziós berendezés ~ms alatti oldatcsereére alkalmas. Saját tapasztalataim szerint minden egyes patch esetén meg kell határozni az oldatcsere kinetikáját, és erre korrigálni a mért áram változást. Történt-e ilyen kísérlet, mivel lehetett pontosan kimérni az aktuális oldatcsere kinetikát? Történt-e korrekció az oldatcsere kinetikájára?**

Ez a kérdés teljesen jogos: egy makroszkópos csatornaáram hirtelen oldatcsere kiváltotta relaxációja csak akkor tükrözi az ionszatórnák kapuzási kinetikai paramétereit, ha maga az oldatcsere lényegesen gyorsabban lezajlik, mint a kiváltott biológiai válasz. Ennek tudatában az ilyen mérésorozatok előtt mindig meghatároztuk az oldatcsere időállandóját. Erre kézenfekvő lehetőséget biztosít a békapetesejtek endogén  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált klorid árama. Ez az áram vagy klorid ionok fenntartott jelenlétében  $\text{Ca}^{2+}$  hirtelen alkalmazásával/elvonásával, vagy  $\text{Ca}^{2+}$  fenntartott jelenlétében  $\text{Cl}^-$  hirtelen alkalmazásával/elvonásával aktiválható/inaktiválható. A  $\text{Ca}^{2+}$  alkalmazása/elvonása az endogén klorid szatórnák kapuját nyitja/zárja, ezért az így kapott áramrelaxációk kinetikáját e szatórnák kapuzási sebessége limitálja. (Például, a  $\text{Ca}^{2+}$  hirtelen elvonásakor mért ~100 ms-os relaxációs időállandó e szatórnák átlagos nyitvatartási idejét tükrözi.) Ezért az oldatcsere sebességének meghatározásához a másik lehetőséget választottuk:  $\text{Ca}^{2+}$  fenntartott jelenlétében az oldat anionjait változtattuk permeábilis klorid és nem permeábilis glukonát között. Ilyenkor a  $\text{Ca}^{2+}$  folyamatosan nyitva tartja az endogén klorid szatórnák kapuját, a mért áramrelaxációk kinetikája tehát pontosan tükrözi a szatórnák pórusát érő oldat ionkoncentrációinak időbeli változását.

Az oldatcsere időállandója csak a TRPM2 szatórnák  $\text{Ca}^{2+}$  elvonásakor mért záródási sebességének mérésekor volt limitáló tényező. Amennyiben az extracelluláris oldat nem tartalmazott  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  elvonásakor mért TRPM2 záródási sebesség (36. B ábra) 54 mérésből  $17 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott (időállandó  $66 \pm 3 \text{ ms}$ ). Ugyanekkor, a  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében mért klorid→glukonát csere sebessége 16 mérésből  $58 \pm 10 \text{ s}^{-1}$  volt (időállandó  $25 \pm 4 \text{ ms}$ ). Ebben az esetben tehát az oldatcsere sebessége a mért biológiai válasznak csak 2-3-szorosa volt, azaz méréseink a szatórnák záródási sebességét némileg alábecsülték. Erre a pontatlanságra nem alkalmaztunk korrekciót, mert a következtetésekre ez nem volt lényeges befolyással, de a közlemény diszkussziójában erre a technikai korlátra, illetve becsléseink ebből adódó pontatlanságára, kifejezetten felhívtuk a figyelmet.

Az összes többi kísérleti felállásban az oldatcsere sebessége nem volt limitáló tényező, hiszen a mért kapuzási időállandók az oldatcsere időállandójánál több mint 10-szer hosszabbak voltak (pl., TRPM2 záródása ADPR elvonásra: ~2 s, WT CFTR záródás: ~250 ms, stb.).

**2. A fentiekhez hasonlóan problémás lehet, különösen nagy áramok esetében az ionok akkumulációja a pipetában, ha pipetába folyó ionáramot mérünk. Jelentett-e ez gondot a Jelölt által végzett kísérletekben? Történt-e erre korrekció?**

Ilyen korrekcióra nem volt szükség, mert inside-out patch-clamp méréseinkben a pipettaoldal ionkoncentráció-változása elhanyagolható volt. Amennyiben e koncentrációk jelentős mértékben eltolódtak volna, megváltozott volna a csatorna áramok reverz potenciálja, illetve az egyedi szatórnák áramamplitúdóinak nagysága, ilyen jelenségeket azonban nem tapasztaltunk.

A kiszakított patch-en átfolyó ionáramok nagyságát, illetve a pipettaoldal térfogatát figyelembe véve ilyen jellegű változások nem is voltak várhatóak. Pl., egy 100 pA nagyságú befelé

irányuló CFTR klorid áram 965 s (~16 perc) alatt 96500 pC negatív töltést, azaz 1 pmol klorid iont juttat be a pipettába. A pipettaoldat térfogatát 10 µl-nek véve ez 0.1 µM-ral növeli meg az eredetileg 140 mM-os oldat kloridion koncentrációját. Ugyanennyivel, 0.1 µM-ral, csökkenne a pipettaoldat eredetileg 140 mM-os Na<sup>+</sup> ion koncentrációja hasonló méretű befelé irányuló TRPM2 áram mérése során. Természetesen feltételezhető, hogy a membránon átfolyó ionok diffúzió révén csak lassan ekvibrálódnak a *teljes* pipetta oldatban, azonban a teljes pipetta-térfogatnak a hegyhez közeli 1/10000 részével történő keveredés is elegendő ahhoz, hogy a fenti esetekben a koncentráció-változás 1 mM, azaz <1%, alatt maradjon.

**3. Az elektrofiziológiai mérések esetében a diffúziós potenciál és az arra vonatkozó korrekció kritikus pontja az adatok értelmezésének. Különösen érdekes ez a kérdés akkor, amikor a pipettán belül különböző mobilitású ionokat tartalmazó oldatokat rétegeztek egymásra. Feltehető ugyanis, hogy az idő előre haladtával a Na<sup>+</sup> és a glukonát ionok eltérő mobilitása miatti diffúziós potenciál az oldatok keveredésével megszűnik. Hogyan vették ezt figyelembe?**

A NaCl/Na-glukonát oldatok határfelületén fellépő diffúziós potenciál méréseink időtartama alatt nem változott lényegesen, a mérések kezdetén a szabad oldatba merülő pipettahegy és a kádoldat között "kinullázott" feszültség ugyanis a mérések közben nem sodródott el ( $\Delta V < 1$  mV) – ezt a mérések végén, a patch "elfújását" követően mindig ellenőriztük.

Amikor ennek volt jelentősége, pl. amikor különböző aszimmetrikus ionkörnyezetekben határoztuk meg az egyedi TRPM2 csatornaáramok amplitúdóinak feszültségfüggését (Tóth és mtsai., 2012, *PNAS* 109:13440-5), akkor az adott körülmények között a pipettahegy és a kádoldat között fellépő diffúziós potenciálokat természetesen mindig megmértük, és a membránpotenciálokat ezekkel korigáltuk.

**Szintén kérdés, hogy a Na<sup>+</sup> glukonát (v glutamát) és a NaCl mennyi idő alatt keveredett olyan mértékben, hogy a patch Cl<sup>-</sup> ionokkal szennyezett legyen?**

A pipettaoldat kb. egyforma térfogatú két rétegének lényeges keveredése kétféle mérhető változást is előidézett volna.

Egyrészt, a felső réteg klorid koncentrációjának lényeges csökkenése a pipetta ezüst/ezüst-klorid elektródjának elektródpotenciálját toltta volna el, ennek következtében eltolódott volna a tartófeszültség. Amint azt már említettem, a mérés során bekövetkező feszültségsodródás lehetőségét minden mérés végén ellenőriztük, de ilyet nem tapasztaltunk.

Másrészt, a klorid ionok megjelenése a pipettahegyben az endogén klorid áram megjelenéséhez vezetett volna. Kísérleti körülményeink között azonban a TRPM2 csatornák aktiválására alkalmazott intracelluláris Ca<sup>2+</sup> még hosszú, több 10 perces, mérések vége felé sem idézett elő mérhető endogén klorid áramot. Bár az endogén klorid áram is mutat "rundown-t", kloridion alapú mérőoldatokkal az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> még a kiszakítást követő több 10 perc után is általában jelentős klorid áramot aktivál. Ezért valószínű, hogy a TRPM2 csatornák vizsgálatára kifejlesztett kísérleti körülményeink között a pipettahegybe még ilyen időtávon sem jutott el jelentős mennyiségű klorid ion.

A 2. és 3. kérdésekre adott válaszaimat összefoglalva tehát a kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy az iondiffúzió sebessége egyrészt elegendően gyors ahhoz, hogy a pipettahegy közvetlen környezetében ne halmozódjon fel, illetve ne depletálódjon, a pipettahegyre feszülő membránon átáramló ionfajta, másrészt viszont elegendően lassú ahhoz, hogy a klorid ionok a pipetta tengelye mentén vándorolva ne juthassanak el a glukonát/klorid határfelületről a kb. 1 cm-es távolságra található pipettahegyig a kísérletek néhány 10 perces időtartama alatt.

**4. Az oocita expressziós rendszer előnyei mellett komoly hátrányokat is hordoz. Az általam vizsgált Kv1.3 csatorna biofizikai tulajdonságai nagyon különböznek az emlős expressziós rendszerben vagy humán T sejtekben mértéktől. TRPM2 esetén ismer-e konkrét különbségeket a két rendszer között (béka oocita vs. emlős expressziós rendszer)? Hogyan viszonyul pl. a béka oocita membrán PIP2 tartalma az emlőshöz?**

A CFTR esetében a békapetesejtben illetve emlős sejtekben kifejezett csatornákat is részletesen vizsgálták, és ezek között semmilyen lényeges eltérést nem tapasztaltak, ugyanez igaz sok más részletesen vizsgált ioncsatornára is, többek között a TRPM2 legközelebbi homológjára, a TRPM8-ra is (pl., Rohács és mtsai., 2005, *Nat Neurosci* 8:626-634; Liu és Qin, 2005, *J Neurosci* 25:1674-81). A TRPM2 csatorna biofizikai tulajdonságait azonban emlős sejtekben mindeddig senki sem vizsgálta. A kérdés felvetése jogos, hiszen a békapetesejtek membránjának lipid összetétele nyilvánvalóan eltér az emlős sejtektől, és e lipidek közül a PIP<sub>2</sub> mindenképpen jelentős TRPM2 csatorna regulátor. A békapetesejt membránjának PIP<sub>2</sub> tartalmáról nem rendelkezünk pontos adattal, azonban a rokon TRPM8 csatornán végzett megfigyelések alapján az feltehetően az emlős sejtekéhez hasonló tartományban mozog.

### **Elképzelhető-e hogy a TRPM2 aktivátoraira vonatkozó irodalmi megállapítások valamilyen módon a használt expressziós rendszertől is függenek?**

Azt elképzelhetőnek tartjuk, hogy különböző expressziós rendszerekben a TRPM2 csatornák szabályozása *kvantitatív* különbségeket mutat, pl. az egyes agonistákkal szembeni érzékenység tekintetében. A méréseink során direkt TRPM2 aktivátorként kizárt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cADPR, illetve piridin dinukleotidok (NAD, NAADP, NAAD) vonatkozásában azonban azt gondoljuk, hogy a különböző egész-sejtes rendszerekben ezekkel előidézett TRPM2 válaszok nem direkt hatások. Egyrészt, kompetíciós kísérletekkel megmutattuk, hogy e nukleotidok egyáltalán nem – még a fiziológiánál 2-3 nagyságrenddel magasabb koncentrációban sem – kötődnek a csatornához. Másrészt, a kereskedelmi forgalomban kapható vegyületek részletes analízise során azonosított jelentős ADPR szennyeződések adekvát magyarázatot adnak az irodalomban leírt hatásokra. E kérdéssel kapcsolatos legújabb tapasztalatainkat a disszertáció beadását követően megjelent közleményben is összegeztük (Tóth és mtsai., 2015, *J Gen Physiol* 145: 419-30).

Mindemellett a békapetesejt rendszer egyértelmű hátránya, hogy e membránok lipidösszetétele 20-25°C hőmérsékleten biztosít megfelelő fluiditást, ezért 30°C felett a patch-ek stabilitása drámaian csökken, 37°C-on pedig a kísérletek sikeraránya elenyésző. A TRP csatorna család nagyon sok tagja kifejezetten hőmérsékletérzékeny, ezért a TRPM2 kapuzási tulajdonságainak hőmérsékletfüggése elsőrendű jelentőséggel bírhat. Miután ennek vizsgálatára a békapetesejt rendszer nem alkalmas, mindenképpen tervezzük a csatorna biofizikai tulajdonságainak vizsgálatára alkalmas emlős expressziós rendszer beállítását.

### **5. A disszertáció 41. oldalán azt írja, hogy a cut-ΔR csatornák aktivációjához nincs szükség előzetes foszforilációra. Felhasználható-e ez a konstrukció a csatorna biofizikai és farmakológiai vizsgálataihoz, ugyanis ekkor meg lehetne takarítani egy a csatorna aktivációját beindító kísérletes lépést.**

Igen, az általunk szerkesztett cut-ΔR csatorna konstrukció azóta a mi munkáinkban (pl., Sorum et al., 2015, *Cell* 163:724–733), de más csoportok munkáiban is (Ai és mtsai., 2004, *Mol Pharmacol* 65:1415-26; Bompadre és mtsai., 2005, *J Gen Physiol* 125:361-75; Bompadre és mtsai., 2005, *J Gen Physiol* 125:377-94; Zhou és mtsai., 2005, *J Physiol* 569:447-57; Yeh et al., 2015, *J Gen Physiol* 145:47-60), gyakran szerepel modellként a CFTR ATP-függő kapuzásának vizsgálatára.

### **6. A 46. oldalon azt írja, hogy patch kitépést követően is egyensúlyt tud tartani egymással a PKA által katalizált foszforiláció és a feltételezhetően a membránhoz asszociált endogén foszfatáz. Ez teljes sejt kísérleteknél könnyen elképzelhető, kitépelt patch esetén azonban, tekintve a membrán folt miniatűr voltát, már kétséges hogy elegendő foszfatáz maradhat-e a membránban. Lehet-e alternatív magyarázata a foszforiláció steady-state beállításának? Van-e független kísérletes bizonyíték arra, hogy elegendő foszfatáz található a kitépelt patch-ben?**

A békapetesejt membránjához asszociált erős szerin-treonin foszfatáz aktivitás kísérleteinkkel egyértelműen alátámasztható.

Egyrészt, a nem injektált petesejtekhez viszonyítva a CFTR-t kifejező petesejtek nyugalmi állapotban is jelentős egész-sejtes klorid konduktanciát mutatnak: ennek nagysága WT csatornákat kifejező sejtek esetén  $\sim 10 \mu\text{S}$  (ld. 11. ábra), az S768A mutáns kifejező sejtek esetében viszont akár  $\sim 200 \mu\text{S}$  (Csanády és mtsai., 2005, *J Gen Physiol* 125:171-86). Miután mindkét csatorna típus kapuzása szigorúan foszforilációfüggő, ez azt tanúsítja, hogy a CFTR csatornák a nyugalmi petesejtekben is jelentős mértékben foszforiláltak, amit tömegspektrometriás mérésekkel is alátámasztottunk. Ennek ellenére, kiszakított patch mérésekben sem a WT, sem az S768A csatornák nem mutatnak számottevő aktivitást a proteinkináz A (PKA) alkalmazása előtt (vö. 15. A, ill. 17. ábrák). Ez arra utal, hogy a csatornák a sejtből való kiszakítás és az inside-out mérés megkezdése között eltelt 1-2 perc alatt gyakorlatilag teljesen defoszforilálódnak.

Másrészt, kiszakított patch mérések során az alkalmazott PKA elvonása a WT CFTR áram azonnali hanyatlását eredményezi, amely defoszforilációt tükröz, hiszen a PKA ismételt alkalmazásával visszafordítható. A PKA elvonását követő deaktiváció egyébként bifázisos: a kináz elvonását követő rendkívül gyors, néhány másodperc alatt bekövetkező, részleges deaktivációt (ld. 15. A ábra, a nyitvatartási valószínűség kb. felére esik) egy ennél nagyságrendekkel lassabb, több perces időállandójú, további hanyatlás követ. Valószínű tehát, hogy az R-doménben a PKA által foszforilált mintegy tucatnyi szerin oldallánc között vannak gyorsabban és lassabban defoszforilálódnak is.

**7. A disszertáció 17. ábra C, D és E panelek összehasonlításakor az tűnik ki, hogy az S768A mutáns csatorna esetében PKA koncentrációtól függetlenül nő az átlagos nyitvatartási idő, ezek értéke kb azonos 55 nM és 550 nM PKA esetében. Ugyanakkor a nyitási valószínűség jelentősen függ a PKA koncentrációtól. A 46. oldalon azonban azt írja, hogy a mutáció megnöveli a csatornák átlagos nyitvatartási idejét, ami miatt megnő a nyitási valószínűség és emiatt növekszik a PKA iránti érzékenység. A bemutatott adatok alapján nem világos, hogy mely paraméterek tudhatók be a mutációnak és mely lépés lesz PKA szenzitív. Kérem ennek kifejtését.**

Ezt a gondolatmenetet az eredményeket bemutató eredeti közleményben részletesen leírtuk, a disszertációban szereplő tömör összefoglalás alapján azonban valóban nem triviális. A 17. D-E ábrákon látszik, hogy a PKA koncentráció emelése mindkét csatorna típus esetében a nyitási sebességet növeli, a záródási sebességre viszont kevésbé hat. A 16. A ábrából viszont egyértelmű, hogy magas PKA koncentrációnál a nyitási sebesség is "telítődik". Ha a záródási sebességet ( $r_{OC}$ ) PKA-függetlennek vesszük, a nyitási sebesség ( $r_{CO}$ ) PKA-dózisfüggésére pedig egyszerű hiperbolikus összefüggést feltételezünk ( $r_{CO} = r_{CO,max} * [PKA] / ([PKA] + K_{r_{CO}})$ ), akkor a nyitvatartási valószínűség ( $P_o = r_{CO} / (r_{CO} + r_{OC})$ ) dózisfüggése is hiperbolikusnak adódik, és a félmaximális aktivitást biztosító PKA koncentráció ( $K_{P_o}$ ) a következőképpen számítható ki:  $K_{P_o} = K_{r_{CO}} * (1 - P_{o,max})$ . Ebből az összefüggésből látszik, hogy a  $P_{o,max}$  növelése szükségszerűen növeli a PKA iránti látszólagos affinitást is (azaz csökkenti a  $K_{P_o}$ -t). Miután  $P_{o,max} = r_{CO,max} / (r_{CO,max} + r_{OC})$ , a záródási sebességnek ( $r_{OC}$ ) a mutáns csatornában észlelt csökkenése (17. E ábra) éppen ezt eredményezi.

**8. A 19. ábrán nagyon látványosan mutatja be a modelleket és modell diszkriminációhoz használt illesztéseket. A C és D ill. az E és F panelek összehasonlításánál az látható, hogy az ábrázolt hisztogramok valóban eltérnek egymástól. Nem látható az azonban, hogy a hisztogramok alakja mennyire függ attól, hogy milyen szélesre választja az események hosszait (bin width). Azt szeretném megkérdezni, hogy milyen elvek szerint választotta ki a bin width-et, és mennyire volt ettől független a modell diszkrimináció és a konklúzió?**

A hisztogramok oszlopszélességének választására nincsenek köbe vésett szabályok, általánosságban minél nagyobb a minta elemszáma, annál keskenyebbé választhatók az oszlopok. Empirikus alapon azt a legkisebb oszlopszélességet választjuk, amely mellett a hisztogram még nem válik túl "zajosná" – ez a választás illusztrálja legjobban a valószínűségi eloszlás sűrűségfüggvényének alakját.

Fontos azonban leszögezni, hogy a hisztogramok csak illusztrációk, a modell diszkrimináció és a következtetések a hisztogramoktól teljesen függetlenek. A modellek maximum likelihood illesztése a nyers adatokhoz történik, ennek során minden egyes regisztrált esemény az ő pontos időtartamával van figyelembe véve. Az ezen illesztések alapján kapott loglikelihood érték tehát objektív mércét ad a modellek közötti választásra (ld. 5.1.3.1. alfejezet és 18. ábra).

**9. A 26. ábra címében az szerepel, hogy az NPPB okozta CFTR stimuláció nagymértékben feszültségfüggetlen. Az ábrán azonban, ha jól értelmezem, akkor rögzített membránpotenciál mellett kapuzó CFTR csatornák láthatók, ill. az NPPB koncentráció a változó. A 64. oldal tetején is azt írja hogy az NPPB hatása feszültség-független és a 26. ábrára hivatkozik. Kérem tisztázza ezt a kérdést röviden.**

A 26. ábra címe és az említett hivatkozás ebben a formában valóban nehezen értelmezhetők. Az NPPB kapuzási hatásának feszültségfüggetlen volta ugyanis a 26. ábrának csak az előző, 25. ábrával történő összevetéséből derül ki: a 26. B ábra azt mutatja, hogy a +60 mV membránpotenciálon kiváltott kapuzási hatás közel azonos a 25. C ábrán bemutatott, -80 mV membránpotenciálon kiváltott hatással. A 64. oldalon valamivel lejjebb megtalálható a helyes hivatkozás is: "Az NPPB kapuzási hatásainak feszültségfüggetlen volta (25. C és 26. B ábrák)".

**A 26. ábrán egyébként jó lett volna a  $\Delta F508$  CF mutáció esetén bemutatni az NPPB hatását, mert ott sokkal nagyobb változásokat várunk mint WT csatorna esetében.**

A megfigyelésünket összegző eredeti közleményben (Csanády és Töröcsik, 2014, *J Gen Physiol* 143:269-87) ezt meg is tettük, a kapuzási hatás a  $\Delta F508$  csatorna esetén valóban sokkal nagyobb, 10-20-szoros volt.

**10. Az NPPB szerkezet-funkció vizsgálata alapján kapott eredményekre építve érdemes lenne jobb tulajdonságú aktivátorokat fejleszteni. Történtek-e erre próbálkozások, és ha igen, akkor milyenek az előzetes eredmények (amennyiben ezek publikusak)?**

Wang és munkatársai (2005, *J Biol Chem* 280:23622-30) leírták, hogy az NPPB pórusblokkoló negatív töltésű karboxilát csoportját amid csoportra cserélve a pórusblokk megszűnik, míg a kapuzást stimuláló hatás megmarad. E megfigyelést saját méréseink is megerősítették, azonban az amid analóg okozta kapuzási stimuláció mértéke messze alatta maradt az eredeti vegyületének. Alternatívaként az intakt NPPB szerkezethez olyan nagy térigényű csoportot lehetne hozzáadni, amely sztérikusan gátolja a pórusba történő bejutást, de nem akadályozza meg a bekötődést a kapuzási kötőhelyhez. Ilyen szubsztituensek tervezését elősegíthetné a kapuzási kötőhely ismerete. Csoportunkban jelenleg folynak is ilyen irányú kísérletek, amelyekhez az amerikai Cystic Fibrosis Foundation-től nyertünk támogatást.

**11. Ismert-e az, hogy a TRPM2 csatorna esetében mi a pórus pontos szerkezete, az aktivációs kapu helyzete, ill., hogy mi biztosítja a ligand kötés és a kapu nyitása közötti kapcsolatot?**

A TRPM2 csatornáról sajnos nem áll rendelkezésre nagy felbontású térszerkezet, ezért a pórus pontos térszerkezete és az aktivációs kapu helyzete nem ismert. Jelenleg a rokon TRPV1 csatornának a közelmúltban krio-elektronmikroszkópiás módszerrel meghatározott 3.4 Å felbontású térszerkezete (Liao és mtsai., 2013, *Nature* 504:107-112) a leghasználhatóbb mintánk. Miután a pórust alkotó hélixek területén viszonylag magas a szekvencia homológia, a pórus vonatkozásában ez a szerkezet valószínűleg nem rossz modell. A TRPV1 csatorna azonban nem rendelkezik a TRPM2 intracelluláris doménjeivel, így ez utóbbiak szerkezete, illetve pórushoz viszonyított elhelyezkedése ismeretlen.

**Tervezték-e olyan vizsgálatokat, melyek ezekre a kérdésekre adnának választ? Ha igen, akkor milyen módszert próbálnak pl. a csatolás vizsgálatára?**

Igen, a csatolás vizsgálata előtt azonban mindenekelőtt a kapu fizikai helyzetét kívánjuk meghatározni. A rokon kation csatornában tapasztaltak alapján erre két lehetséges régió

kínálkozik: vagy maga a szelektáló filter, amely a pórus extracelluláris kb. egyharmadát foglalja magában, vagy a 6-os transzmembrán alfa hélixeknek az intracelluláris membránfelszínhez közeli kereszteződési pontja. Miután a TRPM2 két kinetikailag elkülöníthető kapuval, egy gyors és egy lassú kapuval, rendelkezik (Tóth és mtsai., 2012, *PNAS* 109:13440-5), az is elképzelhető, hogy mindkét régió kapuként szerepel. Ez utóbbi esetben pedig kérdéses, hogy a két fizikailag elkülönülő kapu közül melyik az aktiváló ligandok (ADPR,  $Ca^{2+}$ ,  $PIP_2$ ) által befolyásolt "lassú kapu". E kérdések eldöntésére a SCAM módszert, azaz mesterségesen bevitt ciszteinek szulfhidril-reaktív vegyületekkel történő reakcióját kívánjuk felhasználni. Ezzel a megközelítéssel ugyanis vizsgálható az egyes aminosav oldalláncok citoszolikus oldat felőli hozzáférhetőségének állapotfüggése, azaz, hogy egy-egy ilyen oldallánc csak a kapu nyitott állapotában, vagy pedig nyitott és csukott állapotában is "látható"-e a citoszol felől. Az ehhez szükséges, reaktív endogén ciszteinektől mentes háttérkonstrukció elkészítése jelenleg folyamatban van.

Budapest, 2016. január 13.

Dr. Csanády László