

A TRPM2 csatorna szerkezet-funkció vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Tóth Balázs

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csanády László egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Panyi György, egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Petheő Gábor, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kellermayer Miklós, egyetemi tanár,
az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hegedűs Tamás, tudományos főmunkatárs,
Ph.D.
Dr. Mike Árpád, tudományos főmunkatárs,
Ph.D.

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

Rövidítések	5
1. Bevezetés	7
1.1. NAD(P) ⁺ metabolitok szerepe az intracelluláris Ca ²⁺ koncentráció szabályozásában.....	7
1.1.1. ADP-ribozil ciklázok és termékeik.....	9
1.1.2. Intracelluláris Ca ²⁺ raktárak (endoplazmás retikulum, lizoszóma, mitokondrium).....	11
1.1.2.1. A rianodin receptor (RYP).....	11
1.1.2.2. A TPC csatorna.....	13
1.1.3. Az extracelluláris tér, mint Ca ²⁺ forrás.....	14
1.2. A TRPM2 csatorna.....	16
1.2.1. A TRP család és a TRPM alcsalád rövid bemutatása.....	16
1.2.2. A TRPM2 csatorna topológiája, fontosabb doménjei.....	18
1.2.2.1. Az N-terminális citoplazmatikus rész.....	18
1.2.2.2. A transzmembrán szegmens.....	20
1.2.2.3. A C-terminális citoplazmatikus rész.....	21
1.2.3. A TRPM2 csatorna szabályozása.....	24
1.2.3.1. ADPR és Ca ²⁺	26
1.2.3.2. Oxidatív stressz.....	27
1.2.3.3. Egyéb modulátorok: NAD ⁺ , cADPR, NAADP, O-acetil-ADPR, AMP, Kalmodulin, pH, hőmérséklet.....	28
1.2.4. A TRPM2 szerepe.....	31
1.2.4.1. A TRPM2 csatorna génje és transzkriptumai, szöveti eloszlása.....	31
1.2.4.2. Génkiütött (KO) egereken végzett kísérletek.....	32
1.2.4.3. A TRPM2 lehetséges szerepe fiziológias és kóros körülmények között.....	33
1.2.5. A TRPM2 csatorna szabályozásának vizsgálatát hátráltató technikai korlátok.....	35
1.2.5.1. Egészsejtes és izolált membrános mérések összehasonlítása.....	35
1.2.5.1.1. Az egészsejtes patch clamp technika előnyei.....	35
1.2.5.1.2. Az egészsejtes patch clamp technika hátrányai.....	36
1.2.5.1.3. Az inside-out patch clamp technika előnyei.....	36
1.2.5.1.4. Az inside-out patch clamp technika hátrányai.....	37
1.2.5.2. <i>Xenopus laevis</i> petesejt, mint expressziós rendszer.....	37
1.2.5.2.1. A petesejt rendszer előnyei.....	38
1.2.5.2.2. A petesejt rendszer hátrányai.....	38
1.2.5.2.3. Egy TRPM2-specifikus problémaforrás: a petesejt endogén csatornái.....	39
1.2.5.3. Az egyedi csatorna kapuzás elemzésének korlátja: irreverzibilis inaktiváció.....	39
2. Célkitűzéseink	42
3. Felhasznált módszerek	44
3.1. Oldatok.....	44
3.2. Molekuláris biológia.....	44
3.2.1. Mutánsok készítése, plazmidok felszaporítása.....	44

3.2.2. In vitro cRNS szintézis.....	48
3.3. Petesejt preparálása, injektálása.....	48
3.3.1. Petesejtek izolálása.....	48
3.3.2. Petesejtek kiválasztása.....	48
3.3.3. Petesejtek injektálása.....	48
3.3.4. Petesejtek tisztítása.....	49
3.4. Izolált membrános inside-out patch clamp mérések.....	49
3.4.1. Mérési elrendezés.....	49
3.4.2. Szoros tapadás kialakítása, mérés.....	49
3.4.3. Diffúziós potenciál meghatározása.....	51
3.4.4. Adatok kiértékelése.....	51
3.4.4.1. Makroszkópos áramok kiértékelése az irrevezibilis inaktiváció figyelembevételével.....	51
3.4.4.2. Görbeillesztések: Michaelis-Menten, Hill-, és Gauss-egyenlet.....	52
3.4.4.3. Egyedi csatorna áramok és vezetőképesség vizsgálata.....	54
3.4.4.4. Egyedi csatornák steady-state kapuzási kinetikájának elemzése.....	54
3.5. Fluorimetria, anionok Ca^{2+} affinitásának meghatározása.....	58
3.6. Vékonyréteg kromatográfia (TLC).....	60
3.7. A cADPR enzimatisztítása.....	60
3.8. A H_2O_2 aktivitásának ellenőrzése.....	60
4. Eredmények.....	61
4.1. A megfelelő anion keresése.....	61
4.1.1. Patch clamp mérések.....	61
4.1.1.1. Kontroll mérések.....	61
4.1.1.1.1. Cl^- , mint permeábilis anion.....	61
4.1.1.1.2. Glukonát, mint impermeábilis anion.....	61
4.1.1.2. Glutamát, mint alternatív anion.....	64
4.1.2. Glutamát Ca^{2+} affinitásának meghatározása fluorimetria segítségével.....	64
4.2. A TRPM2 csatorna működését befolyásoló molekulák vizsgálata izolált membrános inside-out patch clamp segítségével.....	68
4.2.1. Az adenosin-difoszfó-ribóz (ADPR) és a Ca^{2+}	68
4.2.2. A hidrogén-peroxid (H_2O_2).....	70
4.2.3. Az adenosin-monofoszfát (AMP).....	73
4.2.4. A ciklikus adenosin-difoszfó-ribóz (cADPR).....	75
4.2.4.1. A kereskedelmi forgalomban kapható cADPR vizsgálata.....	75
4.2.4.2. A cADPR törzsoldat tisztítása.....	76
4.2.4.3. A tisztított cADPR vizsgálata.....	80
4.2.5. A nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP).....	81
4.2.6. A nikotinsav-adenin-dinukleotid (NAAD).....	86
4.2.7. A nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+).....	87
4.3. A TRPM2 csatorna irreverzibilis inaktivációjának kiküszöbölése.....	87
4.3.1. Az inaktiváció molekuláris mechanizmusának vizsgálata.....	87
4.3.2. Pórusmutánsok készítése (a T5L mutáns).....	91
4.3.3. Mutánsok inaktivációjának összehasonlítása.....	93
4.3.4. Alkalmos-e a T5L mutáns a TRPM2 kapuzásának modellezésére?.....	93
4.3.4.1. Vad típusú és T5L mutáns csatorna ADPR és Ca^{2+} iránti affinitásának összehasonlítása makroszkópos mérésekben.....	94

4.3.4.2. Vad típusú és T5L mutáns csatorna kapuzási paramétereinek összehasonlítása egyedi-csatornás mérésekben.....	96
4.3.5. Vad típusú és a mutáns csatornák vezetőképességének összehasonlítása...	98
4.3.6. Vad típusú és T5L mutáns csatorna pórusméretének összehasonlítása.....	102
4.3.7. Az extracelluláris Ca^{2+} hatása a T5L csatorna kapuzására.....	105
4.4. A PIP_2 szerepe a TRPM2 csatorna működésében	108
5. Megbeszélés	111
5.1. Anionok és klorid csatorna	111
5.2. A TRPM2 csatorna közvetlen és közvetett modulátorai	111
5.2.1. Az adenosin-difoszfo-ribóz (ADPR) és a Ca^{2+}	112
5.2.2. A hidrogén-peroxid (H_2O_2)	113
5.2.3. Az adenosin-monofoszfát (AMP)	114
5.2.4. A ciklikus adenosin-difoszfo-ribóz (cADPR).....	115
5.2.5. A nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP)	117
5.2.6. A nikotinsav-adenin-dinukleotid (NAAD).....	118
5.2.7. A nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+).....	119
5.3. A TRPM2 csatorna irreverzibilis inaktivációjának kiküszöbölése.....	119
5.3.1. Az inaktiváció molekuláris mechanizmusának vizsgálata	120
5.3.2. A pórusmutások és a csatorna inaktivációja.....	120
5.3.3. Alkalmas-e a T5L mutáns a TRPM2 kapuzásának modellezésére?.....	121
5.3.4. Vad típusú és pórusmutáns csatornák permeabilitásainak összehasonlítása	122
5.4. A PIP_2 szerepe a TRPM2 csatorna működésében	124
6. Következtetések	126
7. Summary	128
8. Összefoglalás	129
9. Irodalomjegyzék	130
10. Saját publikációk jegyzéke	146
11. Köszönetnyilvánítás.....	147

Rövidítések

[Ca ²⁺] _i	Intracelluláris Ca ²⁺ koncentráció
ADPR	Adenozin-difoszfát-ribóz
ADPRáz	ADP-ribóz hidroláz
ADPRC	ADP-ribozil cikláz
AMP	Adenozin-mono-foszfát
ART	ADPR-transzferáz
ATP	Adenozin-trifoszfát
cADPR	Ciklikus Adenozin-difoszfát-ribóz
CCR	Coiled-coil Region/ α -helikális dimer régió
CICR	Ca ²⁺ indukált Ca ²⁺ felszabadulás
diC ₈ -PIP ₂	Dioktanoil-PIP ₂
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
IP ₃ R	IP ₃ receptor
ITC	Isothermal titration calorimetry/ Izotermikus Titrációs Kalorimetria
K _{1/2}	Félhatásos koncentráció
k _{co}	Nyitási sebességi állandó
K _d	Disszociációs konstans
K _m	Michaelis-Menten állandó
KO állat	Knockout/génkiütött állat
k _{oc}	Záródási sebességi állandó
NAADP	Nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát
NAD(P) ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid(-foszfát)
NUDT9-H domén	NUDT9 Homológia domén
PARG	Poli(ADP-ribóz)-glikohidroláz
PARP	Poli(ADP-ribóz)-polimeráz
PI	Foszfatidil-inozitol
PIP ₂	Foszfatidil-inozitol-(4,5)-biszfoszfát
PMN sejtek	Polimorfo-nukleáris sejtek
P _O	Nyitvatartási valószínűség

Ribóz-5-P	Ribóz-5-foszfát
ROS	Reaktív Oxigén Származék
RYR	Rianodin receptor
SIR2	Silent Information Regulator protein 2
siRNS	Small interfering / Kis interferáló RNS
TLC	Thin layer chromatography / Vékonyréteg kromatográfia
TM	Transzmembrán
TNF α	Tumor Nekrózis Faktor α
TPC	Two Pore Channel
TRP	Tranziens Receptor Potenciál
V _{rev}	Reverz potenciál

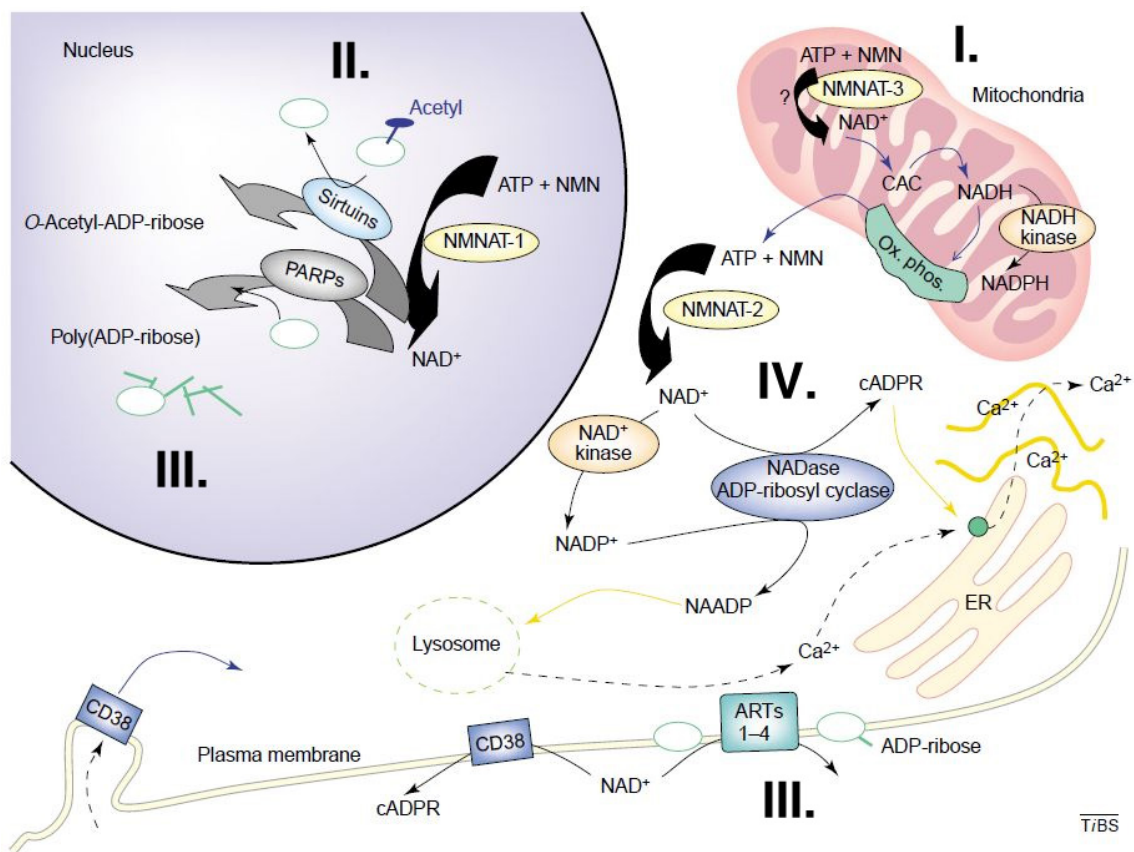
1. Bevezetés

1.1. NAD(P)⁺ metabolitok szerepe az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció szabályozásában

A Ca²⁺ talán az egyik legfontosabb és legsokoldalúbb intracelluláris szabályozó anyag. Már a petesejt megtermékenyítésénél is szerepet játszik, majd az élet során számos fiziológiás (izomkontrakció, szekréció, immunsejtek aktiválása, glukóz-anyagcsere és génexpresszió szabályozása) és patológiás (sejtek poszt-izkémias és reperfüziós károsodása, neurodegeneratív elváltozások, apoptotikus és nekrotikus sejthalál) folyamatban is részt vesz (1-3). A nyugalmi körülmények között alacsony (0,1 μM) intracelluláris Ca²⁺ koncentráció ([Ca²⁺]_i) változása sokféleképpen kódolhatja a sejt működését befolyásoló jeleket. Információt hordozhat a változás amplitúdója, térbeli és időbeli eloszlása. A térbeli változás kiterjedése lehet lokális (polarizált sejtek szekréciójakor), hullámszerűen terjedő (petesejt megtermékenyülésekor), esetleg globális (izomkontrakciónál). Időbeli lefutása lehet pillanatszerű, oszcilláló vagy tartós (4-6).

Mivel a sejt életében a Ca²⁺ jeleknek ilyen fontos szerepük van, ezért az [Ca²⁺]_i pontos és gyors szabályozása elengedhetetlen. Ezt a sejtek kompartmentalizáció révén oldják meg. Intracelluláris Ca²⁺ raktárként működik az endoplazmás retikulum (ER), a lizoszómális rendszer, a mitokondrium és a sejtmaghártya. Továbbá Ca²⁺ juthat be a sejtbe az extracelluláris térből is, a plazmamembránon keresztül (3,7-9). A különböző kompartmentek között a Ca²⁺ transzportját ioncsatornák és ionpumpák végzik. Az ioncsatornák az [Ca²⁺]_i emelésével a Ca²⁺ jelek generálásáért, míg az ionpumpák a Ca²⁺ citoplazmából való eltávolításával elsősorban a nyugalmi körülmények helyreállításáért felelősek (3,6).

A NAD(P)⁺ központi szerepet játszik a sejt energia-termelésében, emellett önmaga és metabolitjai még számos egyéb folyamathoz is nélkülözhetetlenek (1. ábra) (10,11). A NAD⁺ a SIR2 (Silent Information Regulator protein 2) kofaktoraként részt vesz a hiszton fehérjék deacetilálásában, így a génexpresszió szabályozásában (10). A PARP (Poli-ADP-Ribóz polimeráz) és ART (mono-ADP-Ribozil transzferáz) enzimek esetében a NAD⁺ a fehérjék poszttranszlációs módosításához használt ADPR



1. ábra: NAD(P)⁺ és metabolitjainak szerepe a sejt energia-termelésében és egyéb folyamatokban.

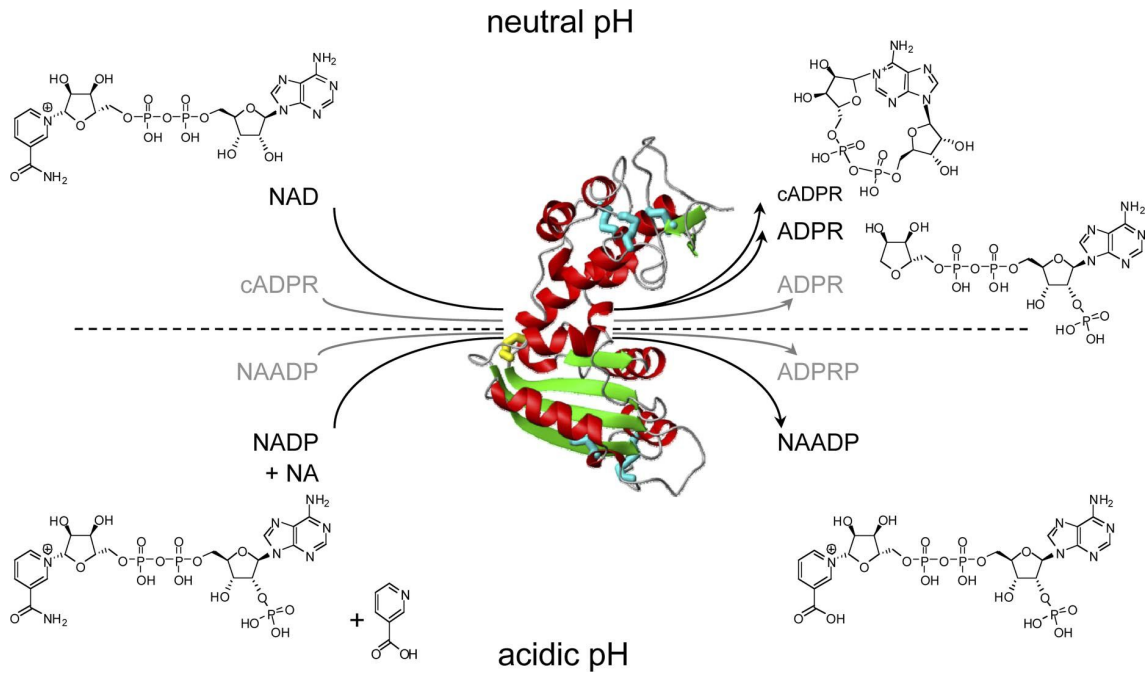
I. Elektrontranszfer redox reakciókban (citrát-kör, β -oxidáció, glukoneogenezis stb.); **II.** SIR2 enzimek kofaktora (génexpresszó szabályozás: hisztonok deacetilálása); **III.** Prekurzor fehérjék poszttranszlációs módosításához (mono- és poli-ADP-ribosilálás); **IV.** Ca^{2+} mobilizáló másodlagos hírvivők előanyaga (ADPR, cADPR, NAADP)

(Berger, F., Ramirez-Hernandez, M. H., and Ziegler, M. 2004, *Trends Biochem. Sci.* 29, 111-118)

prekursoraként szolgál. A PARP enzimek DNS-t érő károsodások hatására fehérjék poli-ADP-ribozilálása révén aktiválják a DNS javító enzimeket, vagy kiterjedtebb károsodás esetén beindítják a sejt apoptózisát. Az ART extracelluláris fehérjét módosít, ennek a sejtadhézióban lehet szerepe (10,11). Végül mind a NAD^+ mind a NADP^+ szubsztrátja az ADP-ribozil ciklázoknak (ADPRC), amelyek számos termékéről (NAADP, cADPR, ADPR) igazolódott, hogy részt vesznek különböző membránok Ca^{2+} permeábilis csatornáinak aktivációjában, és így fontos szerepet játszanak a Ca^{2+} jelek kialakításában (10-13).

1.1.1. ADP-ribozil ciklázok és termékeik

Az ADPRC-ok széleskörűen elterjedt multifunkcionális enzimek (14). Alacsonyabb rendű szervezetekben membránkötött és citoplazmatikus formájuk is ismert, míg emberben eddig csak membránhoz kötött típusokat (CD38 és CD157) találtak (15). Ezeket, ahogy a nevük is mutatja, eredetileg immunsejtek sejtfelszíni antigénjeiként azonosították, de azóta sikerült kimutatni intracelluláris membránokhoz (ER, sejtmaghártya, mitokondrium) kötött ADPRC aktivitást is (16-19). Sőt emlősökben sem zárható ki citoszólikus ADPRC-ok létezése. A környezettől, illetve az elérhető szubsztrátoktól függően többféle reakciót is katalizálhatnak (2. ábra). Neutrális pH-n elsősorban NAD^+ -ból készítenek ADPR-t vagy cADPR-t, míg savas környezetben NADP^+ és nikotinsav jelenlétében NAADP-t szintetizálnak – az utóbbi reakció pH optimuma ~ 4 (20). A különböző termékek ellenére az első lépés mindegyik esetben azonos: a disztális ribóz és a nikotinsavamid közötti kötés hidrolízise. Ezt követően a cADPR szintézisekor a disztális ribóz és az adenin gyűrű egyes pozíciójú nitrogénje között N1-glikozidos kötés alakul ki (közben a szomszédos szénatom aminocsoportja iminocsoporttá alakul), míg az NAADP szintézisekor a nikotinsavamid helyére nikotinsav kerül (15,21). A CD38 kristályszerkezete fényt derített az utóbbi folyamat pH-függésének okára is. Fiziológias pH-n a katalízis során fontos szerepet játszó aminosavak (Glu146 és Asp155) negatív töltéssel rendelkeznek, ami taszítja a szintén negatív töltésű nikotinsavat, gátolva annak aktív helyre történő bejutását. Savas pH-n e két oldallánc protonált, a taszító hatás megszűnik, így szabaddá válik az út a nikotinsav számára a báziscseréhez. Ezt a működési modellt célzott mutációk hatásai is



2. ábra: A CD38 az elérhető szubsztrátoktól és a környezet pH-jától függően különféle reakciókat katalizálhat.

Neutrális pH-n ADPR és cADPR, míg savas pH-n nikotinsav jelenlétében NAADP a fő termék.

(Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T., and Aydin, S. 2008, *Physiol Rev.* 88, 841-886)

alátámasztják: a negatív töltésű aminosavakat semlegesekre cserélve az NAADP szintézisének pH-függése megszűnik (22). A humán CD38 különlegessége még – szemben az alacsonyabb rendű organizmusok ADPRC-aival –, hogy képes a cADPR lebontására is: ennek során a molekulát az N1-glikozidos kötés hidrolízisével ADPR-zá alakítja (15).

Bár a kristályszerkezet feltárta a katalízis mechanizmusát, még mindig nem született egyértelmű válasz az enzim elhelyezkedéséhez kapcsolódó rejtélyre: az ADPRC aktivitás legnagyobb része a plazmamembránhoz köthető, de míg maguk az enzimek az extracelluláris oldalon helyezkednek el, mind a szubsztrátok, mind a termékek által aktivált ioncsatornák ligand kötő helyei intracellulárisan találhatóak. Miért előnyös ez az elrendezés? Milyen egyéb fehérjék vesznek részt a metabolitok szállításában? Lehetséges, hogy az enzim aktivációja során internalizálódik? Vagy a plazmamembránhoz kötött frakciónak más szerepe van, és a Ca^{2+} jelek kialakításában csak az intracelluláris membránokhoz kötött formáknak van jelentőségük? Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásához még további vizsgálatok szükségesek. Azt mindenesetre már igazolták, hogy – bár eltérő ioncsatornákat aktiválnak – az ADPR, a cADPR és az NAADP is hatékony Ca^{2+} mobilizáló NAD(P)^+ metabolitok (13).

1.1.2. Intracelluláris Ca^{2+} raktárak (endoplazmás retikulum, lizoszóma, mitokondrium)

Az intracelluláris Ca^{2+} raktárak olyan kompartmentek, amelyek rendelkeznek megfelelő transzport rendszerrel a Ca^{2+} felvételéhez és leadásához, továbbá a felvett Ca^{2+} -ot valamilyen kötött formában tárolják. Ezekkel a tulajdonságokkal rendelkezik az ER, a lizoszóma, a mitokondrium és talán a sejtmaghártya is (1. táblázat). Az ADPRC termékek a táblázatban felsorolt Ca^{2+} csatornák közül a TPC-re (two-pore channel) és a rianodin receptorra vannak aktiváló hatással.

1.1.2.1. A rianodin receptor (RZR)

Az inozitol-triszfoszfát receptor (IP_3R) után a RZR volt a másodikként felfedezett intracelluláris Ca^{2+} csatorna (23,24). Három típusa ismert, ezek közül a RZR1-et vázizomban, a RZR2-t szívizomban, míg a RZR3-at simaizomban mutatták ki

1. táblázat: Intracelluláris Ca²⁺ raktárak és funkcióik

Kompartment neve	Ca ²⁺ tárolás módja	Ca ²⁺ felvétel a kompartmentbe	Ca ²⁺ leadás a kompartmentből
Endoplazmás retikulum	Kalszekvesztrinhez kötve (3)	SERCA (Ca ²⁺ -ATP-áz) (3)	IP ₃ R, RYR (3)
Sejtmaghártya	Kalszekvesztrinhez kötve (25)	SERCA (Ca ²⁺ -ATP-áz) (7)	IP ₃ R (26), RYR (8)
Endo/Lizoszómális rendszer	kis szerves savakhoz, szulfáthoz, foszfáthoz és polianionos molekulákhoz (polifoszfátok, GAG) kötve (9)	Ca ²⁺ /H ⁺ cserélő* Na ⁺ /Ca ²⁺ cserélő** (9)	TPC (27) TRPM2 (28)
Mitokondrium	Ca-foszfát csapadék (29)	RaM, Ca ²⁺ uniporter (30) RYR*** (31)	Ca ²⁺ /H ⁺ cserélő****, Na ⁺ /Ca ²⁺ cserélő** (30) mPTP***** (32)

GAG: Glukóz-amino-glikán; RaM: Rapid uptake Mode (Gyors felvételi mód); TPC: Two-Pore domain Channel; RYR: Ryanodin Receptor; IP₃R: IP₃-Receptor; mPTP: mitochondrial permeability transition pore (mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus)

* A V-típusú H⁺-ATP-áz által generált H⁺grádiens terhére

** A Na⁺/H⁺ cserélő által létrehozott Na⁺-grádiens terhére

*** A Ca²⁺ elektrokémiai grádiensének megfelelően

**** A légzési lánc által létrehozott H⁺-grádiens terhére

***** Csak patológiás körülmények között

először (33). A RYR emellett egyéb szövetekben – agyban, immunsejtekben, májsejtekben, hasnyálmirigy exokrin szekretoros sejtjeiben – is kifejeződik (33-36). Sejten belül elsősorban az ER-ban található meg, de már a sejtmaghártyában, illetve a mitokondrium belső membránjában is kimutatták a jelenlétét, így az $[Ca^{2+}]_i$ növelésén kívül, részt vehet a sejtmagi Ca^{2+} jelek kialakításában, illetve a mitokondrium Ca^{2+} felvételében is (8,31,37). A vázizomban a RYR1-et a plazmamembránban található dihidropiridin receptor – egy L típusú feszültségfüggő Ca^{2+} csatorna – $\alpha 1$ -alegysége közvetlen kölcsönhatás révén aktiválja (33). Egyéb szövetekben a citoplazmatikus Ca^{2+} a RYR legfontosabb aktivátora, ezért a RYR aktiváció a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} felszabadulás (CICR) nevet kapta (38). A RYR-aktivitás Ca^{2+} dózis-függése haranggörbeszerű, maximuma $\sim 10 \mu M$ -os nagyságrendbe esik (33).

A Ca^{2+} mellett a RYR fontos endogén modulátora a cADPR, amely a csatorna Ca^{2+} -függését a szubmikromólos tartományba tolja el, így a csatorna már nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ mellett is aktiválódhat (39). A cADPR valószínűleg nem közvetlen modulátor, hiszen a RYR-on nem sikerült cADPR kötőhelyet azonosítani. Ezzel szemben a citoplazmában található 12,6 kDa-os FKBP12.6 fehérje, amelynek cADPR-kötő képességét igazolták (40-42), a RYR közvetlen modulátora: a tetramer szerkezetű receptorhoz alegységenként egy FKBP12.6 fehérje kapcsolódik, és ez a kölcsönhatás stabilizálja a RYR zárt állapotát (42). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a cADPR közvetett módon fejtheti ki hatását: az FKBP12.6-hoz kötődve akadályozza e fehérje és a RYR kölcsönhatását, ami a zárt állapot destabilizációjához, azaz a nyitvatartási valószínűség (P_o) növekedéséhez, vezet (33,42).

1.1.2.2. A TPC csatorna

Már az 1990-es években felismerték, hogy az NAADP-indukált Ca^{2+} felszabadulás a citoplazmatikus Ca^{2+} jelek kialakulásának teljesen új, a rianodin és az IP3 receptortól független, útja (20). Az NAADP hatását számos szövetben igazolták, többek között agyban, szívben, májban, T-limfocitákban, hasnyálmirigy acinus sejtekben (35,43-45). Rövidesen az is kiderült, hogy az NAADP hatása a savas kompartmentekhez köthető, ellentétben a másik két úttal, amelyek elsősorban az ER-ból

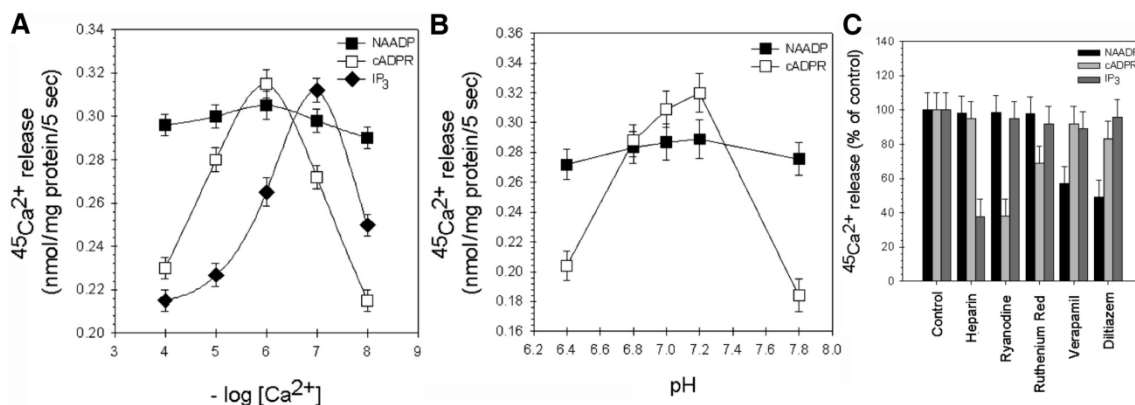
mobilizálnak Ca^{2+} -ot (9). Az intenzív kutatások ellenére magát az NAADP receptort – a TPC csatornát – csak 2009-ben sikerült azonosítani (46-48).

A TPC csatornának emlősökben két típusa fordul elő: a TPC1 elsősorban az endoszómákban, míg a TPC2 a késői endoszómákban és a lizoszómákban (27). Izotópos kötési kísérletek alapján a TPC-k nagy affinitást mutatnak az NAADP iránt, a K_d értéke nM-os nagyságrendbe esik (9). Ennek megfelelően az NAADP a leghatékonyabb Ca^{2+} mobilizáló NAD(P)^+ metabolit. A TPC csatornák NAADP-aktivációjának dózis-hatás összefüggése haranggörbe alakú: míg a nM-os koncentrációjú NAADP aktiválja a csatornát, addig μM -os tartományban egyre csökken a hatása (47,48). A RYR-ral és az IP_3R -ral összehasonlítva az NAADP-indukált Ca^{2+} felszabadulás számos eltérő tulajdonsággal rendelkezik: a Ca^{2+} felszabadulás sebességét fiziológiás tartományban nem befolyásolja a citoplazma Ca^{2+} koncentrációja (vö. CICR) vagy pH-ja, valamint a RYR és az IP_3R gátlószerei (ruténium vörös, magas koncentrációjú rianodin, illetve heraprin), de gátolják az L-típusú Ca^{2+} csatorna antagonisták (verapamil és diltiazem) (3. ábra) (35).

Tekintettel a lizoszóma kis méretére, illetve korlátozott Ca^{2+} tárolási képességére, az NAADP a TPC-k aktiválásával önmagában csak lokális Ca^{2+} jelek kialakítását tenné lehetővé. Azonban a felszabadított Ca^{2+} mintegy triggerként szolgálva – CICR mechanizmus révén – képes a közeli ER-ben található RYR-ok és IP_3R -ok aktiválására, így az egész sejtre kiterjedő, globális Ca^{2+} jelek létrehozására is (9,27).

1.1.3. Az extracelluláris tér, mint Ca^{2+} forrás

Az extracelluláris tér ideális forrás a Ca^{2+} jelek kialakításához, hiszen a szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ itt $\sim 1\text{mM}$, ami négy nagyságrenddel magasabb a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ nyugalmi értékénél. A plazmamembránban található számos Ca^{2+} -ra szelektív csatorna mellett nem szabad megfeledkezni a nem-szelektív kation csatornákról sem, amelyek szintén képesek a Ca^{2+} transzportjára. Az egyik ilyen a TRPM2 csatorna, amelynek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növelő hatását már több tanulmányban igazolták (49-51). A csatorna aktivációjában több ADPRC termék szerepe is felvetődött, de eddig csak az ADPR hatását sikerült egyértelműen bizonyítani (52). Az intenzív kutatások ellenére a TRPM2 szabályozásával és működési mechanizmusával kapcsolatban még mindig sok a nyitott



3. ábra: Intracelluláris Ca²⁺-ot mobilizáló másodlagos hírvivők (IP₃, cADPR, NAADP) hatásának összehasonlítása patkány máj mitokondriumban.

A, Az extravezikuláris Ca²⁺ hatása a telítési koncentrációjú IP₃ (◆) cADPR (□) és NAADP (■) indukált Ca²⁺ felszabadulásra. Az IP₃ és a cADPR Ca²⁺ mobilizáló hatása függ, míg az NAADP-é független az extravezikuláris [Ca²⁺]-tól.

B, A pH hatása a cADPR (□) és az NAADP (■) indukált Ca²⁺ felszabadulásra. Az NAADP hatása független, míg a cADPR-é függ az extravezikuláris pH-tól.

C, Különböző gátlószerek hatása a telítési koncentrációjú IP₃, cADPR, és NAADP indukált Ca²⁺ felszabadulásra. Az IP₃ hatását a heparin, a cADPR-ét a rianodin és a ruténium vörös, míg az NAADP-ét a verapamil és a diltiazem gátolta.

(Mandi, M., Toth, B., Timar, G., and Bak, J. 2006, *Biochem. J.* **395**, 233-238)

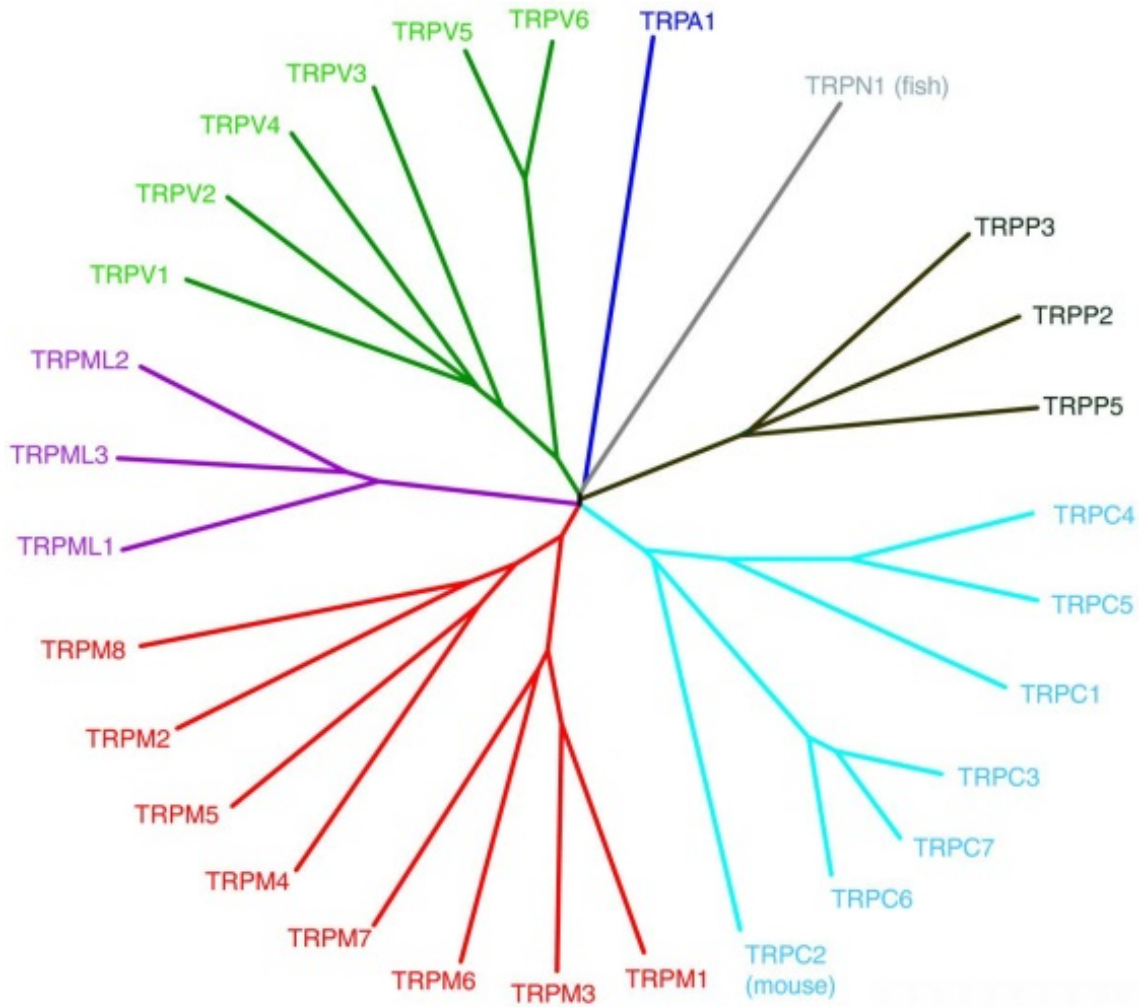
kérdés, ezért munkánk során e csatornát vizsgáltuk izolált membrános inside-out patch clamp technika alkalmazásával.

1.2. A TRPM2 csatorna

1.2.1. A TRP család és a TRPM alcsalád rövid bemutatása

Ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) fotoreceptorát vizsgáló kutatók fényfel történő folyamatos ingerlésre egyes egyedekben csak átmeneti feszültségjelet kaptak válaszul. Mint utóbb kiderült, e fenotípus hátterében egy addig ismeretlen ioncsatorna génjének mutációja állt, amelyet ezért Tranziens Receptor Potenciál (TRP) csatornának neveztek el (53). Azóta különböző élőlényekben szekvencia homológia alapján még számos rokon ioncsatornát azonosítottak, ezek alkotják együtt a TRP csatornák szerteágazó családját. Emlősökben eddig közel 30 TRP csatornát találtak, amelyeket 6 alcsaládba soroltak (4. ábra) (54). A TRPC ("canonical") csatornák mutatják a legnagyobb hasonlóságot az eredeti *Drosophila* fehérjével. A TRPV csatornák az alcsalád első tagjáról, a chili paprika kapszaicin nevű "hatóanyaga" által aktivált vanilloid receptorról kapták a nevüket. A TRPM alcsalád névadója a melasztatin (TRPM1), amelynek csökkent expressziója a melanóma sejtek fokozott metasztatizáló képességével korrelál. A TRPP ("policisztin") alcsalád tagjainak mutációi policisztás vesebetegséggel, míg az intracelluláris membránokban expresszálandó TRPML1 ("mukolipin") csatornái egy neurodegeneratív lizoszómális tárolási betegséggel, a IV-es típusú mukolipidózissal, hozható összefüggésbe. Végül a TRPA csatornák nevüket az N-terminális citoplazmatikus részen található nagyszámú ankyrin ismétlődésnek köszönhetik. Ezen kívül létezik még egy hetedik, TRPN alcsalád is, azonban ilyen csatornákat eddig még csak halakban és gerinctelen állatokban találtak (55-57).

A TRP család közös jellemzője, hogy tagjai kation tetramer szerkezetű csatornák, amelyek aegységei 6 transzmembrán (TM) szakaszt tartalmaznak. Az 5. és a 6. TM szegmens határolja a pórust, az N- és C-terminális végek intracellulárisan helyezkednek el. Alapszerkezetükön kívül viszont legfőbb jellemzőjük a változatosság: változatos ingerekre reagálnak (hőmérsékletváltozás, membránpotenciál-változás, mechanikai hatás, különféle ligandok), és elsősorban integratív, szenzoros funkciókat látnak el (53-57).



4. ábra: A humán TRP csatornák családfája.

Szekvencia homológia alapján a TRP csatornák 7 alcsaládba sorolhatóak. Az egyes alcsaládokat eltérő színek jelölik. A TRPN1 nem fordul elő emlősökben, míg a TRPC2 a humán genomban csak pszeudogénként van jelen.

(Nilius, B. and Owsianik, G. 2011, *Genome Biol.* 12, 218)

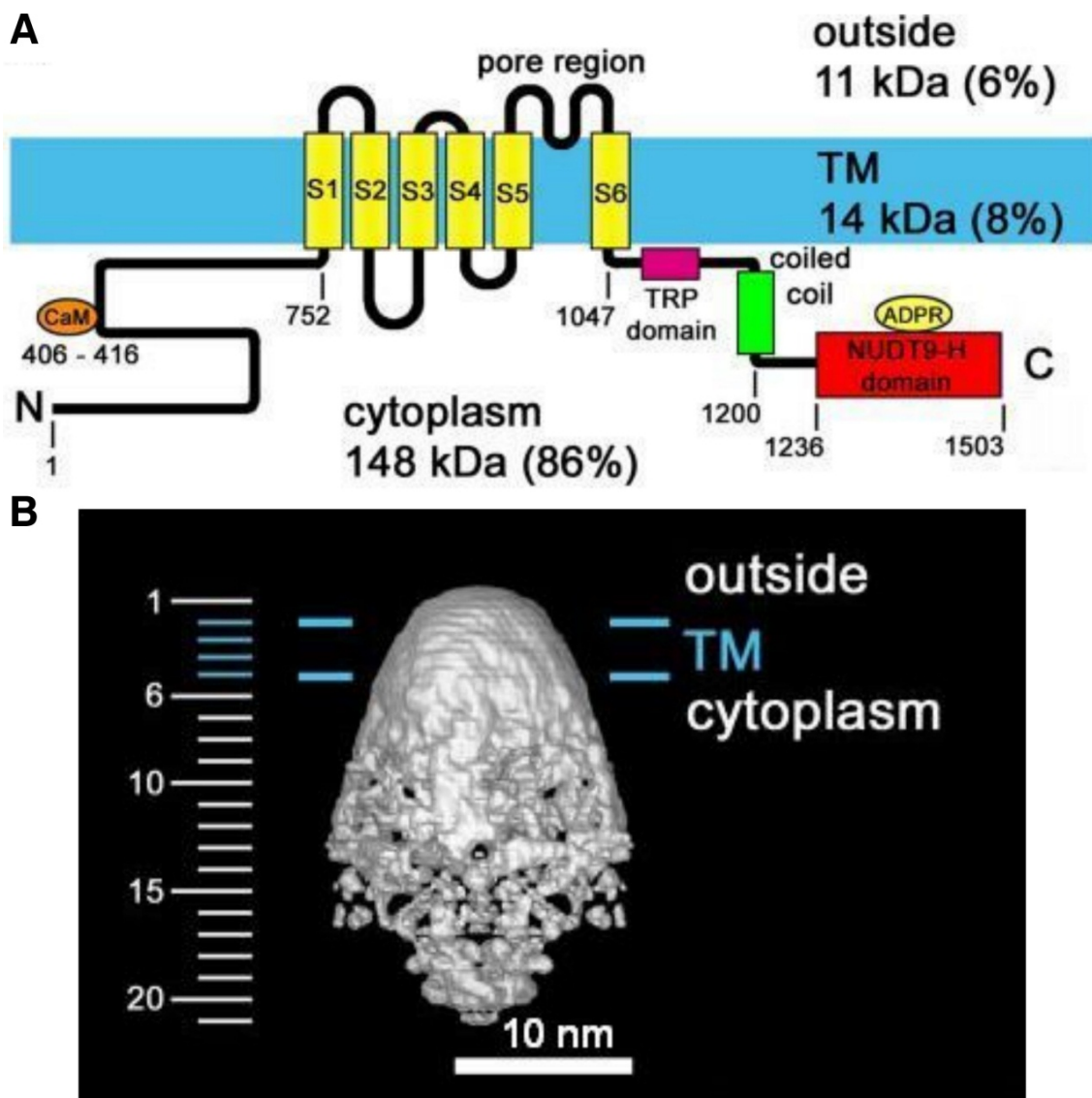
Az általunk vizsgált TRPM2 csatorna az M alcsaládba tartozik. E család tagjai közül a TRPM4 és 5 csak egyértékű kationokra permeábilisak, a TRPM3, 6 és 7 a kétértékűeket preferálják, míg a TRPM1, 2 és 8 nem szelektív kation csatornák (58,59). A TRPM6 és 7 alegységek heterotetramerként is, míg a többiek csak homotetramerként alkotnak csatornákat (60). A TRPM2, 6 és 7 csatornák különlegessége, hogy C-terminális végük enzimatis aktivitással rendelkező domént tartalmaz. A TRPM6 és 7 "chanzyme" doménje protein kináz, míg a TRPM2-é ADPR hidroláz (ADPRáz) aktivitással rendelkezik (56,57). A TRPM1 jelentőségét már korábban említettem, az alcsalád többi tagja közül a TRPM5 az ízérzékelésben, a TRPM6 és 7 a szervezet Mg^{2+} homeosztázisában játszik szerepet, míg a TRPM8 hideg/mentol receptorként ismert (61-63).

1.2.2. A TRPM2 csatorna topológiája, fontosabb doménjei

Sajnos a TRPM2-t eddig nem sikerült kristályosítani, ezért máig sincs pontos képünk a csatorna szerkezetéről. Mindamellet hozzávetőleges szerkezeti információknak több forrásból is van. Egyrészt az aminosav szekvencia hidropátias index elemzésével készült topológiából, amely szerint a TRPM2, a többi TRP csatornához hasonlóan, három főbb részre osztható: a terjedelmes N- és C-terminális citoplazmatikus részre és az őket elválasztó, viszonylag rövid, TM szegmensre (5. A ábra). Ez a durva topológia tovább finomítható az egyes szakaszok ismert szerkezetű fehérjékkel mutatott homológiája alapján (lásd alább). Végül, Maruyama és munkatársai elektronmikroszkópos vizsgálatokból rekonstruálták a teljes csatornaszerkezet alacsony felbontású képét (5. B ábra), amely alapján a négy alegységből álló tetramer csatorna harang alakú, 18 nm átmérőjű és 25 nm magas, továbbá kis extracelluláris és nagy intracelluláris kiterjedés jellemzi (64).

1.2.2.1. Az N-terminális citoplazmatikus rész

Minden TRPM csatorna N-terminális része tartalmaz egy körülbelül 700 aminosavból álló, nagymértékben konzervált régiót, amelyet ezért TRPM homológia doménnek neveztek el. A TRPM2 esetén ez a domén 4 alrégióra osztható fel (N1-N4),



5. ábra: A TRPM2 szerkezete.

A, Az 1503 aminosavból álló TRPM2 topológiája, fontosabb doménjeivel: hosszú N-terminális rész a feltételezett kalmodulin (CaM) kötő IQ-like motívummal; 6 TM szakasz (S1-S6); C-terminális rész, benne a TRP-doménnel, coiled-coil régióval és az ADPR kötéshelyeként szolgáló NUDT9-H doménnel

B, A TRPM2 csatorna elektronmikroszkópos felvételekből rekonstruált oldalnézeti képe. A két kék vonal a plazmamembrán helyét jelöli.

(Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kiyonaka, S., Kato, K., Mori, Y., and Sato, C. 2007, *J. Biol. Chem.* 282, 36961-36970)

amelyeket rövid nem konzervált szakaszok választanak el egymástól (65). Ezekből N-terminálisan számon tartanak még egy nem konzervált N0 régiót. E részeknek elsősorban a fehérje plazmamembránhoz való transzportjában lehet szerepe. Erre utal, hogy bár az N0, illetve az N0-N1 szakaszok eltávolítása nem befolyásolja a TRPM2 expresszióját, az ilyen mutánsok nem mutathatók ki a plazmamembránban (65). Továbbá az ebben a régióban deléciókat tartalmazó TRPM2- Δ N izoformát, amelyben az N4 domén 654-686-os szakasza hiányozik, csökkent expresszió, funkcióvesztés, de érintetlen alegységek közötti interakció jellemzi (66,67). Említést érdemel még a 406-416 közötti aminosav szakasz, amely megfelel egy jól ismert kalmodulin kötő szekvenciának, az "IQ-like" motívumnak. A kalmodulin egy intracelluláris Ca^{2+} szenzor molekula, amely ko-immunoprecipitálható a TRPM2 csatornával, és a feltételezések szerint fokozza a csatorna Ca^{2+} érzékenységét (68). Az "IQ-like" motívum célzott tönkrététele gátolta mind a kalmodulin kötést, mind a csatorna aktiválódást H_2O_2 , ADPR vagy $TNF\alpha$ jelenlétében (69,70).

1.2.2.2. A transzmembrán szegmens

A fehérje központi hidrofób régiója a hidropátias elemzés alapján hat transzmembrán szakaszt, továbbá az ötödik és hatodik szegmens között egy részlegesen a membránba merülő extracelluláris hurkot tartalmaz (65). Az aminosav szekvenciák nagyfokú hasonlósága miatt e régió 3-dimenziós felépítésének mintájául a feszültségfüggő kálium csatornák transzmembrán szegmensének kristályszerkezetét szokták használni (71,72).

A hat transzmembrán szakasz közül az ötödik és a hatodik alkotja a pórust, amely nyitott állapotban hidrofil hidat biztosít az ionok számára a lipid membránon keresztül. Az iontranszport szempontjából nagy jelentősége van az ötödik és hatodik transzmembrán szakaszt összekötő extracelluláris huroknak, amely a tetramer szerkezetben a csatorna pórusának külső szakaszát alkotja. Ezen belül is kiemelkedő jelentősége van egy néhány aminosavból álló szakasznak, a szelektáló filternek, amely meghatározza, hogy a csatorna milyen ionok számára permeábilis (71). Sajnos a TRPM2 csatorna esetében pontos szerkezeti adatok hiányában csak sejteni lehet, hogy melyek e hurok kritikus aminosavai. Ennek vizsgálatára az egyik lehetőség az egyes

aminosavak irányított mutagenezissel történő lecserélése, majd a vad típusú és mutáns csatornák vezetési tulajdonságainak összehasonlítása patch clamp mérésekben. Az irodalom alapján e hurok egyes mutációi valóban megváltoztatták a csatorna szelektivitását, például a D987E vagy a Q981E cserével a csatorna Ca^{2+} permeabilitása nőtt meg, az E1022A cserével pedig a Mg^{2+} permeabilitása emelkedett kétszeresére. Más mutációk (E960A, E960D, D987A) teljes funkcióvesztést eredményeztek, vagy nem befolyásolták a csatorna működését (például D964A, E994A, D1002A) (73). Egy másik klasszikus módszer a "cisztein-scanning", amely különböző pozíciókba bevitt ciszteinek extra-, illetve intracelluláris oldal felőli elérhetőségét vizsgálva nyújt információt a lokális szerkezetről. E módszernek azonban előfeltétele, hogy az eredeti fehérjében szabadon elérhető helyeken ne legyenek ciszteinek, és így a módszer során használt reagensek ne módosítsák a "kontroll" csatorna működését. Sajnos a TRPM2 esetében ez a módszer nem használható, mert a vad típusú csatorna 29 ciszteint tartalmaz, amelyek közül kettőről már megmutatták, hogy más aminosavval nem helyettesíthetők: a pórus hurokban a 996-os vagy 1008-as pozícióban található cisztein alaninra vagy szerinre történő cseréje nem funkcionáló csatornát eredményezett, bár nem befolyásolta a sejtfelszíni expressziót (74).

Fontos szerepe lehet még a hatodik transzmembrán szakasz intracelluláris végének, amely – legalábbis a modellként használt kálium csatornák esetében – az aktivációs kaput alkotja (71). Bár a TRPM2 esetében erre vonatkozó adatok egyelőre nincsenek, a homológia alapján valószínűsíthető, hogy a ligandok kötődése valamilyen módon ennek a régióknak a konformációját megváltoztatva nyitja/zárja a csatornát. A feszültségfüggő kálium csatornákkal ellentétben a TRPM2 kapuzását a membránpotenciál nem befolyásolja, ami jól magyarázható azzal, hogy a TRPM2-ben a feszültség érzékelő domén negyedik transzmembrán szakasza a hat pozitív töltésű aminosav helyett csak egyetlen arginint tartalmaz (72,75-77).

1.2.2.3. A C-terminális citoplazmatikus rész

Ez a régió 4 részre osztható: a TRP-doménre, a coiled coil régióra (CCR), egy nagyjából 30 aminosavat tartalmazó összekötő szegmensre és a 267 aminosavból álló NUDT9 homológia (NUDT9-H) doménre.

A rövid összekötő szegmens szerepe valószínűleg pusztán a NUDT9-H domén fehérjéhez kapcsolása. Erre utal, hogy az egér és humán TRPM2 csatornát összehasonlítva ennek a szakasznak az aminosav szekvenciája jóval kevésbé konzervált, mint a CCR-é vagy a NUDT9-H doméné (65).

A TRP-domén, egy közvetlenül a hatodik transzmembrán szegmens után elhelyezkedő körülbelül 25 konzervált aminosavból álló szakasz, amely a TRPA és TRPP alcsaládok kivételével az összes TRP csatornában megtalálható (53,78). A TRPM, TRPC és TRPV csatornáknál e doménon belül megtalálható az ún. "TRP-box" is, amely hat, az alcsaládon belül nagymértékben konzervált, aminosavat tartalmaz (a TRPM2 esetében ez IWKFQR) (57). A TRP-domén jelentőségét az adja, hogy a számos TRP csatorna szabályozásában szerepet játszó foszfatidil-inozitol-(4,5)-biszfoszfátról (PIP₂) a TRPM8 esetében igazolták, hogy ebben a régióban található pozitív töltésű aminosavakhoz kötődik, és a fehérje C-terminális végét a membránhoz horgonyozva tartja aktiválható állapotban e csatornát (61,79). A TRPM2 esetében a PIP₂ hatását még nem vizsgálták, azonban e kritikus aminosavakat ez a csatorna is tartalmazza, így könnyen elképzelhető, hogy a PIP₂ valamilyen módon a TRPM2 működését is befolyásolja.

A CCR coiled-coil felépítése egy jellegzetes fehérje szerkezeti motívum, amely több egymás köré csavarodott α -hélixet tartalmaz és gyakran játszik szerepet fehérje-fehérje kölcsönhatásokban (80-83). A TRPM családban a CCR, az alegységek közötti kapcsolat biztosításával elősegíti a tetramer szerkezet kialakulását (60,84-87). A coiled-coil szekvenciákra periodikusság jellemző, egy-egy egység 7 aminosavat tartalmaz: (abcdefg)_n. A TRPM csatornák esetében az "a" és "d" pozíciókban tipikusan hidrofób oldallánc található (60,80,86). A TRPM család tagjai CCR szekvenciájuk alapján két csoportba sorolhatóak: a TRPM7-szerűek a TRPM1, 3, 6 és 7, míg a TRPM8-szerűek a TRPM2, 4, 5 és 8. Kristályszerkezet eddig csak a TRPM7 CCR régiójáról készült, ez alapján a tetramer négy α -hélix antiparallel lefutásban csavarodik egymás köré. Az "a" és "d" pozíciójú oldalláncok az α -hélixek felszínén "apoláris szalagként" végigfutva a negyedleges szerkezet belsejében, míg a "b" "c" "f" pozíciójúak a külsején helyezkednek el (60). Az antiparallel elrendeződés meglepő folyamánya, hogy megtöri a 4-szeres központos szimmetriát: ezzel összhangban a TRPM7 C-terminális kináz doménjei dimereket alkotnak. Mivel a TRPM2 CCR szekvenciája némileg eltér a

TRPM7-étől, egyelőre kérdéses, hogy a két szerkezet mennyire hasonlít egymásra; nevezetesen nem tudjuk, hogy a TRPM2 C-terminális NUDT9-H doménjei esetén megmarad-e a 4-szeres szimmetria. Azt mindenesetre már méretkizárásos kromatográfiával sikerült igazolni, hogy az izolált TRPM2 CCR önmagában is tetramert alkot (87). A régió fontosságára utal, hogy deléciója, bár nem változtatja meg a TRPM2 teljes expressziójának mértékét, a sejt felszíni kifejeződést ~50%-kal, az alegységek közötti kölcsönhatást és az egészséges mérések során kapott áramot pedig ~80%-kal csökkenti. Az alegységek közötti kölcsönhatás ko-immunoprecipitációval kimutatható csökkentéséhez nem szükséges a teljes szakasz törlése, elegendő az "a" és "d" helyen lévő hidrofób aminosavak glutaminra történő cserélése is; a hatás nagyjából arányos a lecserélt oldalláncok számával (86). Ugyanakkor ezek a kísérletek arra is rámutatnak, hogy az alegységek közötti interakció, sőt a mérhető funkció ~20%-a még a CCR hiányában is megmarad, tehát más szakaszoknak is lehet szerepe a csatorna összeépülésében.

A fehérje C-terminális részét a NUDT9-H domén foglalja el. Ahogy neve is utal rá, szekvenciája nagy mértékű (~40%) homológiát mutat a mitokondriális NUDT9 enzimmel (76). A NUDT9 enzim a Nudix-hidrolázok közé tartozik, amelyek egy nukleozid-difoszfát és egy ehhez kapcsolódó változatos csoport által alkotott molekula osztály hidrolízisét katalizálják (88). Ezen enzimek központi része a Nudix motívum: G(X)₅E(X)₇REUXEE, ahol U lehet izoleucin, leucin, vagy valin, X pedig bármilyen aminosav. Ez a rész felelős az enzimaktivitásért, míg a molekula többi része határozza meg a szubsztrát specificitást. A Nudix-hidrolázok közös jellemzője a nagyfokú specificitás, egy-egy enzim legtöbbször csak egyféle molekula hidrolízisére képes (89-91). Ez igaz a NUDT9-re – és valószínűleg a NUDT9-H-ra – is, amely csak az ADPR-t hidrolizálja. A reakció során az enzim az ADPR-t, a két foszfát közötti kötés elhasítása révén, AMP-re és ribóz-5-foszfátra bontja (92-94). A NUDT9 és az izolált NUDT9-H domén enzimaktivitását már összehasonlították, s bár ADPR iránti affinitásuk közel azonos ($K_m \sim 100 \mu\text{M}$), a NUDT9-H aktivitása csak 1 %-a a NUDT9-ének (92). E csökkent aktivitás hátterében a Nudix motívum kritikus aminosavainak cseréjét (REF→RIL) feltételezik. Irányított mutagenézissel lecserélték a NUDT9 kérdéses aminosavait és az enzim aktivitása valóban század részére esett (92,93). A csökkent aktivitásnak a csatorna szabályozásában lehet szerepe. Elképzelhető, hogy az

ADPR megkötése nyitja, míg a hidrolízise zárja a csatornát. Ezt látszik alátámasztani, hogy amikor a NUDT9-H doménben "visszautálták" ezt a két aminosavat (RIL→REF), így feltételezhetően meggyorsítva az ADPR hidrolízisét, a csatornát nem lehetett ADPR-zal aktiválni (95,96). Az ADPR kötésének kulcsszerepére utal a nem funkcionáló TRPM2-ΔC izoforma is (97). A NUDT9 kristályszerkezet két részre osztható, egy "cap" és egy "core" részre; feltételezhető, hogy a NUDT9-H is hasonló szerkezetű. A "core" rész tartalmazza a Nudix motívumot, köti meg az ADPR-t és katalizálja a hidrolízist, míg a "cap" rész fokozza a "core" domén ADPR-kötő képességét (92). A TRPM2-ΔC izoforma a "cap" részen tartalmazza a deléciót (az 1292-1325 aminosavak hiányoznak), így elképzelhető, hogy a csatorna azért nem aktiválható, mert a "cap" rész sérülése miatt az ADPR-kötő képessége nagymértékben lecsökkent (97).

1.2.3. A TRPM2 csatorna szabályozása

Az elektronmikroszkópos felvételek alapján készült rekonstrukciós képen (5. B ábra) egyértelműen látható, hogy a csatorna legnagyobb részét az intracelluláris domének adják, kisebb részt képviselnek a transzmembrán szegmensek, míg az extracelluláris térrel csak minimális szakaszok érintkeznek (64). Ennek fényében nem meglepő, hogy a csatorna kapuzását intracelluláris ligandok szabályozzák. Egészsejtes mérésekben számos molekula és ion aktiváló (ADPR, NAD^+ , cADPR, NAADP, H_2O_2 , Ca^{2+}), illetve gátló (ATP, AMP) hatását vizsgálták (50,76,77,96,98-102). Az ilyen kísérletek értékelése azonban alapos körültekintést igényel (lásd: 1.2.5.1. fejezet), mert sokszor nem dönthető el egyértelműen, hogy a kapott eredmény közvetlen vagy közvetett hatást tükröz. A közvetlen modulátorok azonosítására célravezetőbb lenne a TRPM2 csatorna izolált membrános vizsgálata, azonban eddig csak egyetlen ilyen technikát használó átfogó munka jelent meg (52). Ez a tanulmány csak az ADPR és a Ca^{2+} szerepét vizsgálta a csatorna szabályozásában, ezért – az egymásnak ellentmondó eredményekre tekintettel – a többi feltételezett ligand szerepének tisztázásához további vizsgálatok kellenek (2. táblázat).

2. táblázat: A TRPM2 csatorna feltételezett modulátorai

Modulátor	Egészsejtes mérés	Izolált membrános mérés
ADPR	+	+
Ca ²⁺	+	+
H ₂ O ₂	Ø / +	?
NAD ⁺	Ø / -	?
AMP	Ø / +	?
O-acetil-ADPR	+	?
cADPR	+	?
NAADP	+	?
Kalmodulin	+	?

Ø – nincs hatással a TRPM2 áramra

– – gátolja a TRPM2 áramot

+ – aktiválja a TRPM2 áramot

? – nincs adat

1.2.3.1. ADPR és Ca^{2+}

Az ADPR és a Ca^{2+} együttes jelenléte az egészséjtes és az izolált membrános mérésekben is aktiválta a TRPM2-t (52,76,77). Tehát mindkét ligand egyértelműen a csatorna közvetlen aktivátora. A két technikával kapott eredmények között a legjelentősebb eltérés a becsült affinitások között van.

A NUDT9-H domén jelenléte miatt az ADPR hatását az elsők között tesztelték. A mitokondriális NUDT9-en és izolált NUDT9-H doménon végzett biokémiai mérések alapján mindkét "enzim" ADPR affinitását 100 μM körülnek találták (76,92,93,103), ezért a kezdeti egészséjtes mérések során néhány száz μM -os koncentrációban használták az ADPR-t (76,77,100,102). Az újabb eredmények azonban azt mutatták, hogy az aktivációhoz ennél kevesebb, néhány μM ADPR is elegendő (101,104,105). Végül az izolált membrános mérések alapján készült dózis-hatás görbe egyértelműen megmutatta, hogy a csatorna ADPR iránti látszólagos affinitása $\sim 1 \mu\text{M}$, és 10 μM már gyakorlatilag telítési koncentrációt jelent (52). Ez a koncentráció tartomány összeegyeztethető a csatorna fiziológiás szabályozásával is, hiszen az intracelluláris $[\text{ADPR}] \sim 5 \mu\text{M}$ (105).

A Ca^{2+} esetében még nagyobb eltérések vannak a két technika között. A legtöbb egészséjtes mérésben az intracelluláris oldalt dializáló pipettaoldatban kevesebb mint 1 μM -os szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -t alkalmazva több nA-es áramot kaptak, ami alapján a Ca^{2+} K_d -ját néhány száz nM-ra becsülték (50,68,70,105). Ugyanakkor izolált membrános mérésekben ennél jóval magasabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kellett a csatorna aktiválásához ($K_d \sim 20 \mu\text{M}$), és az egyedi csatornák kapuzási kinetikájának Ca^{2+} -függése jól leírható volt – alegységenként egy Ca^{2+} kötőhelyet tartalmazó – Monod-Wyman-Changeux (MWC) modellel (52). A két technikával kapott eredmények közötti eltérésnek több oka is lehet. Egyrészt elképzelhető, hogy az izolált membrános mérések során elveszítettek valamilyen – a nagy Ca^{2+} affinitás biztosításához szükséges – intracelluláris faktort. A legkézenfekvőbb ilyen faktor a csatornával ko-immunoprecipitálható kalmodulin lehetne (69), illetve a PIP_2 , amely több TRPM csatorna ismert regulátora (61,79,106-108). Azonban az izolált patch membránok intracelluláris felszínének kalmodulinnal vagy PIP_2 -vel történő perfúziója sem eredményezett nM-os Ca^{2+} affinitást (52). Egy másik lehetőség, hogy az egészséjtes mérésekben használt $\sim 1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} messze nem

telíti a TRPM2-t, csak a csatornák nagy száma eredményez – alacsonyabb nyitvatartási valószínűség (P_o) mellett is – makroszkópos áramot. Mivel $1 \mu\text{M}$ -nál magasabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t egyik egészséjtes mérésben sem teszteltek, ez a lehetőség sem zárható ki. Végül, bár az egészséjtes mérések során Ca^{2+} pufferek alkalmazásával szabályozták az oldatok szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -ját, ez nem feltétlenül elégséges a csatorna Ca^{2+} kötőhelyei körüli lokális $[\text{Ca}^{2+}]$ alacsonyan tartásához. Különös tekintettel arra, hogy maga a TRPM2 pórus permeabilis Ca^{2+} -ra, így az extracelluláris térből beáramló Ca^{2+} telítésben tarthatja a kötőhelyeket. Ezt támasztja alá, hogy extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében még alacsonyabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is elegendő a csatorna aktiválásához (50,68). E megfigyelés alapján még extracelluláris Ca^{2+} kötőhely létét is feltételezték (68), azonban az izolált membrános mérések igazolták, hogy valójában a Ca^{2+} permeációja áll az extracelluláris Ca^{2+} kapuzási hatásának hátterében (52). Ennek fiziológiai jelentősége az lehet, hogy ha a csatorna egyszer aktiválódik, utána már a beáramló Ca^{2+} biztosítja – egyfajta pozitív visszacsatolásként –, hogy a csatorna mindaddig nyitva is maradjon amíg az ADPR jelen van, függetlenül az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ további változásaitól.

1.2.3.2. Oxidatív stressz

A TRPM2 heterológ expressziója kapcsán nagyon hamar kiderült, hogy e csatornát kifejező sejtek nagyobb arányban pusztulnak el az őket érő oxidatív stressz hatására (69,98,109-111). Az oxidatív stressz modellezésére általában H_2O_2 -ot használtak, de más reaktív oxigén származékok (ROS), illetve reaktív nitrogén származék (RNS) képzők is hasonló hatást váltottak ki (95,98,112). A legegyszerűbb magyarázat, hogy a H_2O_2 a TRPM2 csatorna aktivációján keresztül az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tartós növekedéséhez vezet, ami beindítja a sejtek apoptózisát (69,98,109-111).

A fő kérdés az maradt, hogy a H_2O_2 közvetlenül, kritikus aminosavak oxidálásán keresztül, vagy közvetett módon a NAD^+/NADH arány eltolása (112), illetve ADPR felszabadítása révén, aktiválja-e a TRPM2-t.

Közvetlen hatásra utalt, hogy egy tanulmány szerint a H_2O_2 képes volt aktiválni a NUDT9-H doménben delécióit tartalmazó, és így ADPR inszenzitív, ΔC izoformát is (97) – azonban ezeket az eredményeket egy másik csoport nem tudta reprodukálni (95). Egy másik munkában izolált membrános mérésekben mutattak H_2O_2 kezelést követően

néhány csatorna nyitást, azonban ezután ADPR adásával nem tesztelték, hogy a látott hatás háttérében valóban TRPM2 csatornák kapuzása áll-e (113).

A közvetett modell alátámasztására sokkal több és meggyőzőbb eredmény van. Egyrészt, szemben az ADPR-zal vagy a Ca^{2+} -mal, a H_2O_2 aktiváló hatása az alkalmazott koncentrációtól függően csak hosszabb-rövidebb késés után jelentkezik, és a H_2O_2 elvonása után sem azonnal záródnak be a csatornák (98,109,110). Másrészt a H_2O_2 nem aktiválta a TRPM2-t PARG deficiens sejtekben, illetve PARP-1 inhibitorok jelenlétében (112,114-117), miközben ismert, hogy az oxidatív stressz a PARP/PARG rendszer aktiválásán keresztül ADPR felszabadulást eredményez. További érv, hogy míg a citoplazmatikusan túlexpresszáltatott NUDT9 (ADPRáz aktivitásának köszönhetően) az ADPR és a H_2O_2 indukálta TRPM2 áramot is gátolta, addig a mitokondriális formáé csak a H_2O_2 hatását befolyásolta, az intracellulárisan alkalmazott ADPR-ét nem (95).

Bár a fenti eredmények összessége alapján a közvetett mechanizmus tűnt valószínűbbnek, tovább bonyolította a képet, amikor kiderült, hogy egészsejtes mérésekben a H_2O_2 megnöveli a TRPM2 csatornák ADPR iránti látszólagos affinitását (101,104). Nyilvánvaló, hogy a legmeggyőzőbb választ jól tervezett izolált membrános kísérletek adhatnák.

1.2.3.3. Egyéb modulátorok: NAD^+ , cADPR, NAADP, O-acetil-ADPR, AMP, Kalmodulin, pH, hőmérséklet

Az ADPR-on kívül más NAD(P)^+ metabolitok – mint szerkezeti rokonok – szerepe is felvetődött a TRPM2 szabályozása kapcsán, azonban ezekhez a kísérletekhez is csak egészsejtes méréseket használtak, és a kapott eredmények is többször ellentmondásosak.

Legelőször a NAD^+ -ot vizsgálták, ami képes volt a TRPM2 csatorna aktiválására (77,98,101,118). Ehhez azonban nagyon magas, 1 mM-os, koncentrációban kellett alkalmazni, és hatása még így is csak késéssel jelentkezett. Emellett az izolált NUDT9-H domén izotermikus titrációs kalorimetriás (ITC) vizsgálatával nem sikerült NAD^+ kötődést kimutatni (103). Ez valószínűsíti, hogy a TRPM2 aktivációt nem a NAD^+ közvetlen hatása okozza. Az egyik magyarázat, hogy a NAD^+ minták ADPR szennyezést tartalmaztak. Tekintettel a TRPM2 magas ADPR iránti affinitására ($K_d \sim 1$

μM), már 0,1 %-os szennyezés is jelentős áramot indukálhatott. A másik lehetőség, hogy a sejtekben jelenlévő enzimek hatására a NAD^+ -ból a nikotinsavamid lehasítása révén ADPR keletkezett, és ez aktiválta a csatornákat. Természetesen a szerkezeti hasonlóság miatt a közvetlen aktiváció sem zárható ki, ezért a kérdés eldöntésére még további vizsgálatokra van szükség.

A cADPR-zal kapott eredmények még ellentmondásosabbak. Több tanulmány számolt be arról, hogy a cADPR aktiválja a TRPM2 csatornát (119), sőt ADPR-zal együtt fokozzák egymás aktiváló hatását (101,102). Azonban más csoportok mérései ezt nem tudták megerősíteni (76,98,105). A cADPR közvetlen hatása ellen szól, hogy bár szerkezetileg rokona az ADPR-nak, alakja jelentősen eltér attól. Míg az ADPR lineáris molekula, addig a cADPR inkább gömbszerű (2. ábra), így valószínűleg teljesen más ligand-kötőhelyet igényelne. A cADPR közvetlen aktiváló hatását leginkább az a közlemény kérdőjelezi meg, amelyben kimutatták, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható cADPR jelentős mennyiségű ADPR szennyezést tartalmaz; e szennyeződést eltávolítva a cADPR önmagában már nem volt képes a TRPM2 aktivációjára (105). Sajnos e munkában a szinergia lehetőségét nem vizsgálták, és a cADPR tisztítására használt eljárás technikai problémákat is felvet (lásd 4.2.4.2.). Ugyanakkor a cADPR lehetséges közvetett hatásairól sem szabad elfeledkezni: az adenin gyűrű 1-es pozíciójú nitrogénje és a disztális ribóz közötti N1-glikozidos kötés felszakadásával ADPR-zá metabolizálódhat (15). Emellett a cADPR jól ismert másodlagos hírvivő molekula, amely a II-es és III-as típusú rianodin receptoron keresztül Ca^{2+} -ot mobilizál az intracelluláris raktárakból (1. ábra) (40-42,120,121), ami szintén hozzájárulhat az egészséjtes mérések során tapasztalt TRPM2 aktiváló hatásához.

A cADPR-hoz hasonlóan az NAADP, egy másik széleskörűen tanulmányozott intracelluláris Ca^{2+} -ot mobilizáló ADP-ribozil cikláz termék, is jelentős TRPM2 áramot indukált egészséjtes mérésekben (102). Sőt ADPR-zal együtt alkalmazva jelentős szinergiát figyeltek meg a két metabolit között (104). Az NAADP az ADPR-hoz hasonlóan lineáris molekula, szerkezetében két ponton tér el az ADPR-től (2. ábra): egyrészt az NAADP nem-nukleozid ribózának 2-es pozíciójú szénatomjához egy foszfátcsoport kapcsolódik, másrészt a disztális ribóz 1-es szénatomjához nikotinsav kapcsolódik. Ez annak köszönhető, hogy az NAADP NADP^+ -ból szintetizálódik, illetve hogy a nikotinamid helyére báziscserével nikotinsav kerül (2. ábra) (21). Ezen eltérések

ellenére az NAADP alakja sokkal közelebb áll az ADPR-éhez, mint a cADPR-é, így elképzelhető, hogy hatását akár a NUDT9-H ADPR kötőhelyéhez közvetlenül kötődve fejt ki, bár ebben az esetben együttes jelenlétükkor inkább kompetíciót várnánk, semmint szinergiát. Figyelembe véve, hogy az NAADP a TPC csatornák aktiválásával Ca^{2+} -ot szabadíthat fel a lizozómális raktárból (1. ábra) (9,46-48), az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növelésén keresztül közvetett módon is aktiválhatja a TRPM2-t; az eltérő támadáspontok miatt ez a feltevés jobban magyarázná a mérések során tapasztalt szinergiát.

Egészsejtes mérésekben az ADP-ribozil cikláz termékeken kívül egy hiszton deacetiláz termék, az ADPR disztális ribózának 2' vagy 3' -OH csoportjának acetilációjával keletkező O-acetil-ADPR, is hatékony aktivátornak bizonyult (103,122). Az ADPR-hoz hasonló szerkezeten kívül az O-acetil-ADPR közvetlen hatása mellett szól az is, hogy izotópos leszorításos kötési kísérletek alapján ez a molekula az ADPR-zal közel megegyező affinitással kötődik az izolált NUDT9-H doménhez (103).

A sok potenciális TRPM2 aktivátor molekula mellett, egészsejtes mérések során az AMP-t lehetséges gátlószerként azonosították (101,102,104), bár ezt a gátlást nem minden tanulmány tudta megerősíteni (105). Mivel az AMP az ADPR bomlási terméke (76,93), ezért elképzelhető, hogy a NUDT9-H domén ADPR kötőhelyéért vetélkedve kompetitív gátlószerként viselkedik. Ezt az feltételezést erősíti, hogy ITC mérések alapján az AMP valóban képes a NUDT9-H doménhez kötődni (103). Egy másik lehetőség, hogy az AMP kötőhelye N-terminálisan, valamelyik TRPM-homológia doménben található, tekintve, hogy az AMP gátolja a TRPM4 csatornát is (123), amely nem tartalmaz NUDT9-H domént, viszont az N-terminális szakaszon nagyfokú homológiát mutat a TRPM2-vel. Ebben az esetben az AMP allostérikusan, nem-kompetitív módon gátolhatná a TRPM2 csatorna aktivitását. Végül mivel az AMP számos intracelluláris folyamatot befolyásol, a gátló hatás mérési körülmény, illetve sejttípus függése közvetett mechanizmusra is utalhat.

Említést érdemel még a kalmodulin, amely ko-immunoprecipitációval igazolhatóan kötődik a TRPM2-höz (69). Egészsejtes mérésekben a kalmodulin fokozta, míg a kalmodulin-antagonista kalmidazolium gátolta a TRPM2 áramot (68). A kalmodulin feltételezett kötőhelye a TRPM2 már korábban említett "IQ-like" motívuma,

mert e szakasz pontmutációkkal való tönkretétele megszüntette a két fehérje interakcióját, illetve a kalmodulin aktiváló hatását (69,70).

Több munkacsoport is vizsgálta az extra- és intracelluláris pH hatását a TRPM2 aktivitására. Ezekben a kísérletekben az alacsony pH a csatorna reverzibilis gátlását, illetve irreverzibilis inaktivációját okozta, ami arra utal, hogy a protonoknak akár több támadáspontja is lehet (124-127). Az eredményekből úgy tűnik, hogy a reverzibilis inaktivációt a protonok az intracelluláris oldalról okozzák – az extracelluláris protonoknak csak nyitott csatorna esetén, permeáció után volt ilyen hatásuk. E hatás során a protonok célpontjai akár a Ca^{2+} kötőhelyek is lehetnek (126,128). Ezzel szemben az irreverzibilis gátlás a csatorna extracelluláris szájánál található aminosavakhoz volt köthető (125,127).

Bár korábbi munkák számos TRP csatorna aktivitásának hőmérsékletfüggését igazolták már, a TRPM2 esetében ezt eddig csak egyetlen cikkben vizsgálták. Ebben azt találták, hogy intakt sejtekben a 35°C feletti hőmérséklet fokozza az ADPR, a NAD^{+} és a cADPR aktiváló hatását (119).

1.2.4. A TRPM2 szerepe

Bár a TRPM2 csatorna élettani funkciója egyelőre nem ismert pontosan, az eddig bemutatott eredmények, a csatorna expressziós térképe, valamint a génkiütött (KO) állatokon végzett kísérletek eredményei adnak némi iránymutatást a lehetséges fiziológiás és patológias szerepére nézve.

1.2.4.1. A TRPM2 csatorna génje és transzkriptumai, szöveti eloszlása

A TRPM2 génje a 21. kromoszómán található, egy körülbelül 90 kb hosszú szakaszon, amely 32 exont tartalmaz (129). Az összes exont tartalmazó érett transzkriptum 6,5 kb hosszú, ez kódolja az 1503 aminosavból álló, teljes TRPM2 fehérjét – TRPM2-L (long) (65). Emellett azonban leírtak még több izoformát is, amelyek az alternatív – esetleg hibás – splicing-nak köszönhetően rövidebb fehérjék kódolnak. Ezek közül talán legjelentősebb a TRPM2-S (short), amely csak a fehérje N terminális citoplazmatikus részét és az első két transzmembrán szegmenst tartalmazza

(130). A TRPM2-S össze tud épülni teljes hosszúságú TRPM2 alegységekkel, azonban a normális pórust alkotó négy darab ötödik és hatodik transzmembrán szegmens hiányában az így keletkező heterotetramerek nem képesek iontranszportra. Domináns negatív hatásának köszönhetően a TRPM2-S expressziója csökkentheti a működőképes TRPM2 csatornák számát (131), így szerepe lehet a csatorna szabályozásában. Mivel a TRPM2-S izoforma nem tartalmazza a C-terminális CCR szakaszt, tetramerizációja arra utal, hogy a csatornák összeépülésében az N-terminális, illetve a transzmembrán résznek is fontos szerepe lehet. HL-60 sejtekben és neutrofil granulocitákban sikerült kimutatni még két, delécióit tartalmazó izoformát, a TRPM2- Δ N-t és a TRPM2- Δ C-t (97). A TRPM2- Δ N-ben a fehérje N-terminális részén a 11. exon középső, 538-557 pozíciójú aminosavakat kódoló része hiányzik. Ez a variáns nem képez funkcionáló csatornát és valószínűleg hibás splicing eredménye (67). Érdekesebb a TRPM2- Δ C izoforma, itt a teljes 27-es exon, az 1292-1325 aminosavat kódoló rész hiányzik. Ez a deléció a NUDT9-H domént érinti, és ezek a csatornák nem aktiválhatók ADPR-zal, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy az ADPR valóban ezen a doménon keresztül fejt ki aktiváló hatását (70,97).

A TRPM2-L csatorna számos szövetben kifejeződik, legnagyobb mennyiségben idegsejtekben (132,133), a hasnyálmirigy inzulint szekretáló β -sejtjeiben (110,119), szívizomsejtekben (115), endothelsejtekben (131), neutrofil granulocitákban (104,105,134), T limfocitákban (49,102), monocitákban (51,76,77,135) és mikroglia (100) sejtekben van jelen. Expressziója az agyon belül sem egyenletes, legkifejezettebb az agykéregben, a hippocampusban és az oxidatív stresszre kifejezetten érzékeny striatum (nucleus caudatus és putamen) területén (98,118,136,137).

Bár a TRPM2 alapvetően a plazmamembránba lokalizált csatorna, jelenlétét lizoszómális membránokban is kimutatták (28,138). Ugyanakkor a protonok TRPM2-re gyakorolt gátló hatásának fényében nehéz elképzelni, hogyan működhet ez a csatorna ebben a savanyú kompartmentben.

1.2.4.2. Génkiütött (KO) egereken végzett kísérletek

A TRPM2 csatorna funkciójának megértésében nagy előrelépést jelentett a TRPM2 KO egerek elkészítése és vizsgálata. A csatorna szöveti eloszlásának

megfelelően a tapasztalt változások két területet érintettek: a glukóz anyagcserét és az immunválaszt.

A glukóz metabolizmus vonatkozásában a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulin szekrécióját, és normál, illetve magas zsírtartalmú diétán tartott állatok anyagcseréjét vizsgálták. A TRPM2 deficiens β -sejtekben csökkent glukóz-, illetve incretin-indukált inzulin szekréciót találtak. Az elégtelen inzulin elválasztás miatt a normál diétán tartott TRPM2 KO állatok csökkent glukóz toleranciát mutattak (139), ugyanakkor a túltáplált állatok esetében a KO egereknél a perifériás szövetek nagyobb inzulin-érzékenységet és glukóz felhasználását mérték (140).

Az immunrendszert vizsgálva ennél jelentősebb eltéréseket találtak. A jelenleg elfogadott szemlélet szerint az immunválasz során a fagocitákban termelődő ROS a kórokozók pusztítása mellett aktiválja a TRPM2 csatornákat is, s az ezekben beáramló Ca^{2+} hozzájárul a kemotaxis és a citokintermelés kiváltásához (51). Az akut hatások mellett a TRPM2 deficiens dendritikus sejtek érése is zavart szenved (28). Ennek megfelelően a KO egerek fokozott érzékenységet mutatnak egyes bakteriális fertőzésekre (141), ellenben védettnek bizonyulnak az autoimmun eredetű colitis ulcerosa modellezésére használt DSS-indukált colitissel szemben (51). Érdekes módon a lipopoliszacharid (endotoxin) indukált gyulladásra a TRPM2 deficiens egerek bizonyultak érzékenyebbek. Esetükben a tüdőszövet fokozottabb polimorfo-nukleáris sejtes beszűrődését, jelentősebb szöveti destrukciót és rosszabb túlélést tapasztaltak. Ezt a szerzők azzal magyarázzák, hogy a ROS a nem szelektív TRPM2 kation csatorna aktiválása révén depolarizálja a membránt, ami mintegy negatív visszacsatolásként gátolja a membránpotenciál-érzékeny NADPH oxidázt. E gátló hatás kiesése vezethet a KO egerekben fokozott ROS termeléshez és szöveti károsodáshoz (142). Bár e tanulmányok nem adtak pontos képet a TRPM2 csatorna immunsejtekben betöltött szerepéről, azt egyértelműen megmutatták, hogy hiányában az immunválasz szabályozása zavart szenved.

1.2.4.3. A TRPM2 lehetséges szerepe fiziológias és kóros körülmények között

A fentiek alapján a TRPM2 csatornának fiziológias körülmények között szerepe lehet a hasnyálmirigy β -sejtjeiben az inzulin szekréció szabályozásában (119,139).

Annak kiderítésére, hogy ez a szerep milyen módon kapcsolódik a klasszikus, ATP-szenzitív K^+ csatornákhöz kötődő útvonalhoz, további vizsgálatok kellenek. Mivel a TRPM2 nem szelektív kation csatorna, a folyamatot valószínűleg az $[Ca^{2+}]_i$ növelésével segítheti elő. Ez történhet akár közvetlenül a Ca^{2+} transzportjával, akár közvetve a plazmamembrán depolarizálásával, amely a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákat aktiválja. A fő, egyelőre tisztázatlan, kérdés inkább az, hogy milyen úton valósul meg a TRPM2 csatorna glukóz-függő aktivációja.

Már a korai eredmények felvetették, hogy az oxidatív stressz indukálta TRPM2 áramnak jelentősége lehet a ROS termeléssel járó neutrofil granulocita aktivációban (102,104). Ugyanakkor a KO állatokkal végzett kísérletek arra is felhívták a figyelmet, hogy a csatorna immunválaszban betöltött szerepe ennél sokkal összetettebb: befolyásolja az dendritikus sejtek érését, a monociták és a neutrofil granulociták kemotaxisát, illetve citokin termelését. Ezáltal a szervezet kórokozók elleni védelme mellett patológiás körülmények között egyes autoimmun kórképek kialakulásához is hozzájárulhat (28,51,141,142).

Végül fontos megemlíteni azokat a sejtípusokat (neuronok, szívműködő sejtek, endothelsejtek), amelyekben a TRPM2 csatorna fiziológiai szerepéről semmilyen információnk nincs, ugyanakkor patológiás körülmények között – legalább részben – ez a csatorna lehet felelős e sejtek károsodásáért. Intaktsejtes mérések alapján a TRPM2 csatorna heterogén expressziója fokozza a sejtek érzékenységét az oxidatív stressz iránt. Ennek mérhető paraméterei a H_2O_2 hatására bekövetkező membrán permeabilitás változás, az $[Ca^{2+}]_i$ változása, illetve a sejtek apoptotikus pusztulásának mértéke. A H_2O_2 kezelés következtében a kontroll, TRPM2-t nem expresszáló, sejtekkel összehasonlítva a TRPM2-t kifejező sejtek membránjának kationok iránti permeabilitása fokozódik (131), az $[Ca^{2+}]_i$ jobban megemelkedik (100), és a sejtek is nagyobb arányban pusztulnak el (69). Ennek a fordítottja is igaz. Vagyis, ha TRPM2 csatornát természetes módon expresszáló sejtekben TRPM2-specifikus siRNA-sel gátoljuk a csatorna szintézisét, akkor csökken e sejtek érzékenysége az oxidatív stressz iránt (143). Ezekre az eredményekre alapozva feltételezik, hogy a TRPM2-nek szerepe lehet e szövetek iszkémiás-reperfúziós károsodásában. Stroke vagy myocardialis infarktus esetén a sejtek nemcsak az iszkémia következtében pusztulnak: az iszkémiát túlélő sejtekben a reperfúzió során nagy mennyiségű ROS keletkezik, amely TRPM2

aktiváción keresztül a Ca^{2+} homeosztázis összeomlását, s e sejtek halálát okozhatja (109,115,144). Az akut folyamatok mellett az oxidatív stressz okozta TRPM2 aktivitásnak krónikus neurodegeneratív betegségekben is szerepe lehet. Az amyloid β -peptid, az Alzheimer-kórra jellemző szenilis plakkok egyik fő komponense, oxidatív stressz közvetítésével a striatális neuronok pusztulását okozza, amely a TRPM2 csatorna aktivitásának gátlásával megelőzhető (145). Ugyanakkor, amiotrófiás laterálszklerózisban, Parkinson demenciában, és bipoláris zavarban szenvedő betegekből izolált TRPM2 mutációk arra utalnak, hogy a csökkent TRPM2 működés is betegséghez vezethet (146,147).

Ezek alapján a TRPM2 a krónikus gyulladások (51,148) és a cukorbetegség kezelésében (139), illetve az agyi/myocariális iszkémiát követő reperfüziós károsodás csökkentésében (115,149) is ígéretes terápiás célpont lehet.

1.2.5. A TRPM2 csatorna szabályozásának vizsgálatát hátráltató technikai korlátok

1.2.5.1. Egészsejtes és izolált membrános mérések összehasonlítása

Ahogy az eddigiekből is látható a TRPM2 csatorna megismeréséhez eddig főként egészsejtes méréseket alkalmaztak. Egyedül az ADPR és a Ca^{2+} hatását vizsgálták meg részletesen izolált membrános inside-out patch clamp technikával. Az eddigi eredmények értelmezéséhez érdemes összehasonlítani a két technikát.

1.2.5.1.1. Az egészsejtes patch clamp technika előnyei

- Mivel a teljes membránon átfolyó áramot mérjük, ezért még akkor is makroszkópos áramot kaphatunk, ha a vizsgálandó ioncsatorna csak kis példányszámban fejeződik ki.
- Egyes csatornák működéséhez bizonyos citoplazmatikus faktorokra is szükség van (például kalmodulin, redukáló környezet). Bár a pipettaoldat jelentősen felhígítja a citoplazmát, nem szünteti meg teljesen e faktorok hatását.
- Az extracelluláris oldat szabadon cserélhető. Ez olyan csatornák vizsgálatánál hasznos, amelyek működését extracelluláris faktorok szabályozzák (például acetilkolin-receptor).

1.2.5.1.2. Az egészsejtes patch clamp technika hátrányai

- Egy sejt csak egy mérésre használható.
- A pipettaoldal csak fokozatosan dializálja a sejt belsejét, ez korlátozza az intracelluláris ligand által vezérelt csatornák (például TRPM2) kapuzásának kinetikai vizsgálatát.
- A pipettaoldal nem, vagy csak nagyon körülményesen, cserélhető. Így intracelluláris ligand által vezérelt csatornáknál egy mérésben csak egyféle, adott koncentrációjú ligand hatása tesztelhető. Mivel egy sejt csak egyszer használható, a különböző sejtekben viszont a csatorna expressziójának mértéke nagyon eltérő lehet, ezért az ilyen mérésekből származó dózis-hatás görbék, illetve különböző ligandok relatív hatékonyságának összehasonlítása csak fenntartásokkal fogadható el.
- Bár a citoplazmát a pipettaoldal jelentősen felhígítja, az enzimek, sejtalkotók, egyéb citoplazmatikus faktorok továbbra is jelen vannak. Hatásuk – például a pipettaoldalban található, vizsgált ligand metabolizációja – nem kontrollálható. Így nehezen dönthető el, hogy a ligand közvetlen vagy közvetett módon befolyásolja a csatornák működését.

1.2.5.1.3. Az inside-out patch clamp technika előnyei

- A mérést egy nagy sejtől kiszakított apró membránfolton ("patch") végezzük, így egy sejtől több patch is húzható.
- A membránfolt kis mérete miatt akár egyetlen csatorna működése is vizsgálható.
- A membránfolt intracelluláris oldala a szabadon és gyorsan cserélhető kádoldattal érintkezik ("inside-out"). Ez a konfiguráció nagyon előnyös intracelluláris ligand által vezérelt csatornák vizsgálatánál.
- A membránfoltot kiszakítjuk a sejtől, így a csatorna működése a különböző intracelluláris faktorok zavaró hatása nélkül vizsgálható. Ezáltal a közvetlen hatást kifejtő ligandok könnyen azonosíthatók.

1.2.5.1.4. Az inside-out patch clamp technika hátrányai

- A membránfolt kis mérete miatt makroszkópos áramot csak a csatornáknak jóval nagyobb fokú expressziója esetén kaphatunk, mint egészsejtes mérések esetén.
- Egyes intracelluláris faktorok jelenléte szükséges lehet a csatorna működéséhez, még akkor is, ha fiziológias körülmények között nem vesznek részt a csatorna aktiválásában. Például a TRPM8 esetén a PIP_2 hozzájárul a pórus nyitott konformációjának fenntartásához, hiányában a csatornák deaktiválódnak (61,79). A kiszakított membrán konfigurációban ezeket az intracelluláris faktorokat is biztosítani kell. Ennek hiányában – például, ha a faktor nem ismert –, az aktiválható csatornák száma a mérés során fokozatosan csökken. A kiértékelés során ezt is figyelembe kell venni.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy míg a sejtélettani kérdések vizsgálatához az egészsejtes konfiguráció a legalkalmasabb, magának a csatorna fehérjének a biofizikai jellemzésére ez nem áll fenn. Ebben a vonatkozásban az egészsejtes mérések elsősorban extracelluláris ligand által szabályozott, feszültségfüggő valamint kis számban kifejeződő ioncsatornák vizsgálatában lehet hasznos. Azonban intracelluláris oldalról szabályozott csatornák részletes biofizikai vizsgálatához, közvetlen és közvetett modulátorainak azonosításához az inside-out technika egyértelműen előnyösebb. Ezek fényében, különös tekintettel az ellentmondó eredményekre, érdemes lenne megvizsgálni a többi TRPM2 ligand hatását is izolált membrános mérésekben.

1.2.5.2. *Xenopus laevis* petesejt, mint expressziós rendszer (150)

Az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) petesejt az elektrofiziológiában széleskörűen használt expressziós rendszer. Általános előnyei és hátrányai mellett érdemes áttekinteni egy, a humán TRPM2 vizsgálata kapcsán fellépő problémát, a petesejt endogén ioncsatornáit.

1.2.5.2.1. A petesejt rendszer előnyei

- Egyszerre több száz sejt nyerhető egy békából.
- A petesejtek igen ellenállóak. Fenntartásukhoz nem igényelnek különleges felszerelést.
- A sejtek meglehetősen nagyok – akár 1,3 mm átmérőjűek is lehetnek –, így könnyen injektálhatók RNS-sel.
- A sejtek megbízhatóan expresszálják a bejuttatott idegen RNS-eket.
- A rendszer lehetővé teszi mutáns konstrukciók egyszerű, gyors előállítását.
- Az injektált RNS mennyiségének változtatásával egyedi csatornás vagy makroszkópos mérésekhez optimális felületi csatornasűrűség érhető el.
- Az alacsony inkubációs hőmérséklet (18°C) miatt a sejtekben olyan mutáns csatornák is kifejeződnek, amelyek 37 °C-on már nem lennének stabilak.
- A petesejtek kevés endogén csatornát tartalmaznak.

1.2.5.2.2. A petesejt rendszer hátrányai

- Bár kevés endogén csatornát tartalmaznak, azok zavarhatják a mérést, ha együtt aktiválódnak a mérendő exogén csatornákkal, különösen, ha az utóbbiak száma vagy árama kicsi.
- A fehérjék poszttranszlációs módosítása – glikozilálása, foldingja – elvileg eltérő lehet, mint egy emberi sejtben. Így a csatornák elvileg másképpen viselkedhetnek, mint eredeti környezetükben.
- A sejtek minősége évszakfüggő. Nyáron nehezebb velük dolgozni.
- A békák kétéltűek, ezért a vizsgálatok szobahőmérsékleten végzendők. 30°C-nál magasabb hőmérsékleten a petesejtekből izolált patch-ek nem stabilak. Ez az alacsonyabb hőmérséklet viszont befolyásolhatja az expresszáltatott emlős csatornák működését.

E korlátok ellenére a *Xenopus* petesejt hasznos és kényelmes expressziós rendszer.

1.2.5.2.3. Egy TRPM2-specifikus problémaforrás: a petesejt endogén csatornái

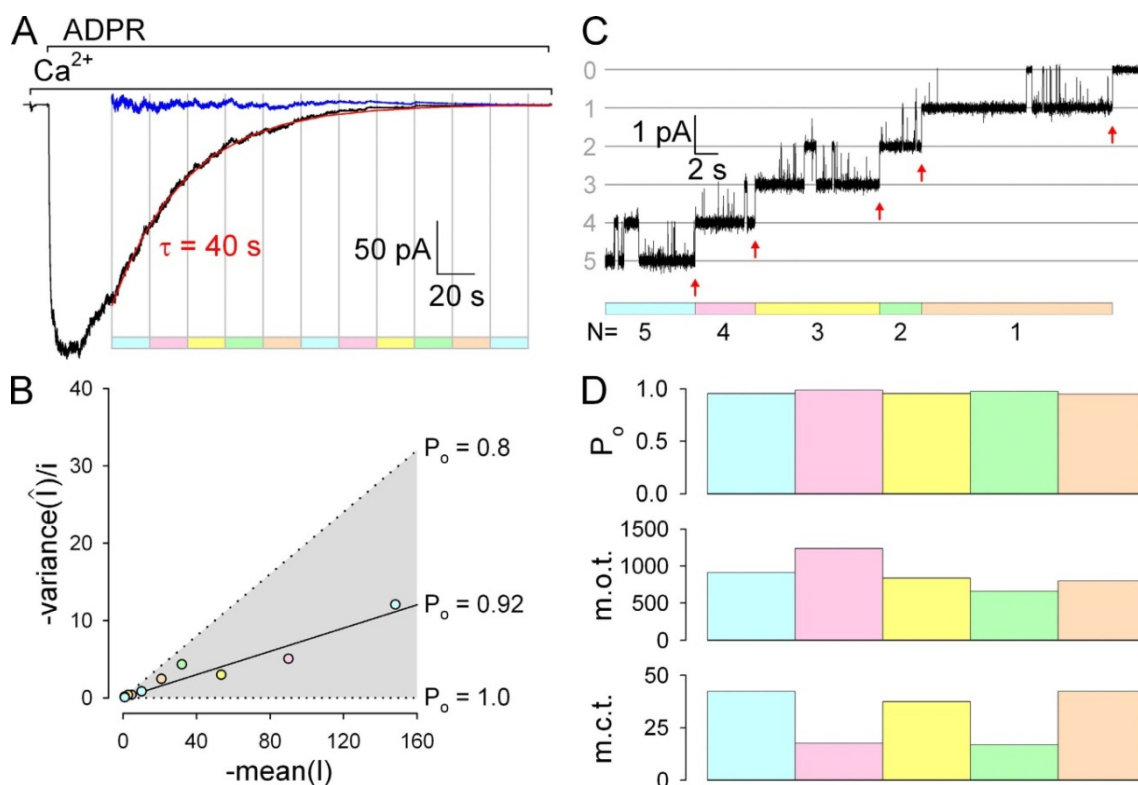
A *Xenopus* petesejt endogén csatornái közül méréseinket kétféle befolyásolja, a Ca^{2+} -aktivált Cl^- csatorna és a feszülés- ("stretch") aktivált csatornák.

A feszülés-aktivált csatornák a mérés során a membránban létrejövő mechanikus feszülés hatására aktiválódhatnak. Nem szelektív ioncsatornák. Egy csatorna vezetőképessége körülbelül 35 pS. Számuk sejtenként és sejtrégióként változó. Háromértékű kationokkal – például gadoliniummal – blokkolhatók, ám ez befolyásolhatja a vizsgált csatorna működését is, ezért ha a patch sok ilyen csatornát tartalmaz, akkor érdemes helyette újat húzni a sejt egy távolabbi részéből.

Nagyobb problémát jelent a Ca^{2+} -aktivált Cl^- csatorna (Cl_{CaC}), amely a petesejt endogén áramának nagy részéért felelős. A csatorna vezetőképessége 3 pS. Bár neve szerint Cl^- csatorna, valójában nem-szelektív anion csatorna, amely a Cl^- mellett számos más anion transzportjára is képes. E csatornák citoszólikus Ca^{2+} hatására aktiválódnak (151). Működésüket Ca^{2+} kelátorok (EGTA, BAPTA), illetve impermeábilis anionokat tartalmazó oldatok alkalmazásával lehet blokkolni. Mivel az általunk vizsgált TRPM2 csatorna nyitásához szintén szükség van intracelluláris Ca^{2+} -ra, ezért a kelátorokat nem alkalmazhatunk. Ez tette szükségessé, hogy az oldatokban hagyományosan használt Cl^- aniont más, nem transzportálódó anionnal helyettesítsük.

1.2.5.3. Az egyedi csatorna kapuzás elemzésének korlátja: irreverzibilis inaktiváció

A TRPM2 csatorna izolált membrános vizsgálatánál a legnagyobb problémát az okozza, hogy a patch kiszakítása után a maximálisan aktiválható áram exponenciálisan csökken (6. A ábra). Ezt elméletileg okozhatja a csatornák számának fogyása, permeabilitásának csökkenése, vagy kapuzási kinetikájának változása. Variancia analízis segítségével igazolták, hogy a folyamat során a csatornák nyitvatartási valószínűsége változatlan marad (6. B ábra). Az egyedi csatornák áramát különböző időpontokban megvizsgálva abban szintén nem találtak változást (6. C ábra). Bár ilyen körülmények között az egyedi csatorna mérések elemzése nehezített, úgy tűnik, a kapuzási kinetika sem változik az idő múlásával (6. D ábra). Összegezve, az áram fogyását nem az egyes csatornák működésének megváltozása, hanem az aktiválható



6. ábra: A TRPM2 csatorna irreverzibilis inaktivációja izolált membrános inside-out patch clamp mérésekben

A, A fekete görbe a telítési koncentrációjú ADPR és Ca^{2+} mellett regisztrált makroszkópos TRPM2 áram. A piros görbe az áram időbeli lefutására illesztett exponenciális, a kék pedig a mért áram és az illesztés különbsége. A színes hasábok a variancia analízishez használt időablakokat jelölik.

B, A színes pontok az egyes időablakokban mért skálázott variancia értékeket reprezentálják a hozzájuk tartozó átlagos áram függvényében. A pontok végig jól illeszkednek a 0,92-as nyitvatartási valószínűséghez (P_o) tartozó egyeneshez. Az áramcsökkenést nem a P_o változása okozza.

C, Telítési ADPR és Ca^{2+} koncentráció mellett mért egyedi csatorna események. Az inaktiváció során az egyedi csatornák árama nem változik.

D, A C panelen látható rövid időablakok korlátozott elemzésével nyert egyedi csatorna kapuzási paraméterek: P_o , átlagos nyitvatartási idő (m.o.t.) és átlagos zárvatartási idő (m.c.t.). A sztochasztikus fluktuációtól eltekintve ezen paraméterek értéke sem mutat tendenciózus változást az idő függvényében.

(Csanady, L. and Torocsik, B. 2009, *J. Gen. Physiol* 133, 189-203)

csatornák számának csökkenése, azaz irreverzibilis inaktiváció okozza (52). Ez az irreverzibilis inaktiváció már a makroszkópos áramok vizsgálatakor is problémát okoz. A különböző szakaszok összehasonlításakor a mért értékeket korigálni kell a folyamatosan csökkenő csatornaszámmal. A steady-state csatorna mérések részletes analizéséhez viszont nélkülözhetetlen az állandó csatornaszám. Ezért azon túl, hogy az inaktiváció háttérében álló molekuláris mechanizmus feltárása önmagában is izgalmas kihívás, fontos lenne valamilyen módot találni e probléma megszüntetésére.

2. Célkitűzéseink

Kutatásunk során a TRPM2 csatorna szerkezet-funkció vizsgálatát végezzük afrikai karmosbéka petesejtekben inside-out patch clamp technika alkalmazásával. Kitűzött céljaink négy csoportra bonthatóak:

1. Mielőtt hozzáláttunk volna a TRPM2 csatorna vizsgálatához, keresnünk kellett egy aniont, amelyre a $Cl_{Ca}C$ csatornák nem permeábilisak. Ezzel az anionnal helyettesítve a Cl^- ionokat megszabadulhatunk az endogén csatornák okozta háttéráramtól. A szakirodalomban (52) erre a célra használják a glukonátot, azonban ennek az anionnak több korlátja is van. Bár nátrium sójának oldékonysága viszonylag jó, Ca^{2+} sója már sokkal rosszabbul oldódik. Ráadásul erősen köti is a Ca^{2+} -ot (52), ezért még 20 mM-os szabad Ca^{2+} koncentráció sem érhető el segítségével. Ráadásul nem kapható szabad sav formájában, így nem párosítható tetszőleges kationnal.

Mivel vizsgálni kívánjuk a TRPM2 csatorna permeabilitását különböző kationok iránt, ezért először fontos találni egy alkalmas aniont, amellyel ilyen típusú mérések során a Cl^- helyettesíthető. E helyettesítő anionnal szembeni elvárások a következők:

- Ne transzportálódjon a $Cl_{Ca}C$ -n keresztül, így ne okozzon járulékos áramot.
- Legalább 30 mM szabad Ca^{2+} -ot tartalmazó oldatát is el lehessen készíteni.
- Nagy tisztaságú formában, szabad anionként kapható legyen.

Ehhez elvégzendő vizsgálatok:

- $Cl_{Ca}C$ permeabilitásának vizsgálata különböző szerves anionokra izolált membrános inside-out patch clamp segítségével.
- A $Cl_{Ca}C$ -án nem átjutó anionok Ca^{2+} kötő képességének meghatározása fluorimetriás módszerrel.

2. A korábbi egészséjtes mérések számos molekulát azonosítottak, amelyek befolyásolhatják a TRPM2 csatorna működését (H_2O_2 , AMP, cADPR, NAADP, NAD^+). Ugyanakkor a sejt nukleotid és Ca^{2+} homeosztázisát biztosító intracelluláris rendszerek jelenléte miatt, ilyen mérésekkel nem dönthető el, hogy az adott anyag a csatornához kötődve (közvetlen módon) vagy csak az elsődleges ligandok, a Ca^{2+} és az ADPR, lokális koncentrációjának megváltoztatásával (közvetett módon) fejt ki hatását. Ennek fényében nem meglepő, hogy a más-más sejt típusokat használó, különböző

munkacsoportok eltérő, sokszor egymásnak ellentmondó, eredményeket kaptak e molekulák hatásáról, hatékonyságáról. Vizsgálataink célja volt, hogy eldöntsük, vajon közvetlen vagy közvetett úton befolyásolják-e a TRPM2 csatorna működését ezek az anyagok.

Ehhez elvégzendő vizsgálatok:

- A különböző molekulák TRPM2 csatornára kifejtett hatásának vizsgálata izolált membrános inside-out patch clamp segítségével.
- A dinukleotid törzsoldatok tisztaságának vizsgálata vékonyréteg kromatográfia (TLC) segítségével.

3. A TRPM2 csatorna kapuzásának részletei máig ismeretlenek. Ennek tisztázásában nagy segítséget nyújthatna a steady-state egyedi csatorna mérések analízise. Azonban a kísérletek során a TRPM2 csatornák ~ félperces időállandóval irreverzibilisen inaktiválódnak (6. ábra), ennek következtében nem lehet állandó csatornaszám mellett elegendően hosszú méréseket végezni ezekhez az elemzésekhez. Ezért megpróbáltuk feltárni, hogy milyen molekuláris mechanizmus állhat az inaktiváció hátterében, és valamilyen módot találni a folyamat lassítására/megszüntetésére. További célunk volt annak kiderítése, hogy ezen változtatások után a rendszer alkalmas marad-e a vad típusú TRPM2 csatorna modellezésére?

4. A PIP_2 számos TRPM csatorna működésének szabályozásában szerepet játszik. E csatornáknál a PIP_2 feltételezett kötőhelye a TRPM2-ben is megtalálható TRP-domén, ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy e foszfolipid befolyásolja-e a TRPM2 csatorna aktivitását is?

Ehhez kapcsolódó kérdéseink:

- Exogén PIP_2 adásával lassítható-e a TRPM2 csatorna irreverzibilis inaktivációja?
- A polilizin – az endogén PIP_2 maszkolásával – befolyásolja-e a TRPM2 működését?
- Exogén PIP_2 adása megváltoztatja-e a csatorna Ca^{2+} affinitását?

3. Felhasznált módszerek

3.1. Oldatok

A felhasznált oldatokat az 3. táblázat tartalmazza.

3.2. Molekuláris biológia

Az 5,6 kb nagyságú, humán TRPM2 csatornát kódoló cDNS szakasz a pGEMHE plazmid EcoR1 és Xba1 restrikciós enzim hasítási pontjai közé illesztve állt rendelkezésünkre, míg a hTRPM8 cDNS-ét egy pGEMSH plazmid tartalmazta. Molekuláris biológiai módszereket a plazmidok felszaporítására, a csatornát kódoló mRNS in vitro szintézisére, illetve különböző TRPM2 mutánsok létrehozására használtunk.

3.2.1. Mutánsok készítése, plazmidok felszaporítása

A mutáns csatornákat kódoló plazmidokat célzott mutagenézis (Stratagene QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit) segítségével állítottuk elő. A PCR-hez használt oligonukleotid primereket a 4. táblázat tartalmazza. Az újonnan szintetizált plazmidokkal TOP 10 (Invitrogen) kompetens *E. coli* sejteket transzformáltunk. Mivel a pGEMHE plazmid β -laktamáz gént tartalmaz szelektív markerként, ezért a sikeresen transzformált klónok kiválasztásához ampicillint használtunk. A felszaporított plazmid klónokat Qiagen Miniprep/Midiprep Kit segítségével tisztítottuk meg, a tisztítás sikerességét és a visszanyert DNS mennyiségét 0,9 %-os agaróz gélen vizsgáltuk (7. ábra). A kívánt mutációk meglétét, egyéb mutációk hiányát automata szekvenálással (LGC Genomics) ellenőriztettük. A szekvenáláshoz használt primerek szintén a 4. táblázatban láthatóak. A kapott szekvenciákat ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) és CAP3 (<http://deepc2.psi.iastate.edu/aat/cap/cap.html>) programok segítségével hasonlítottuk össze. A kész plazmidokat -80°C -on tároltuk a későbbi felhasználásig.

3. táblázat: A mérésekhez felhasznált oldatok.

Név	Összetétel	Alk.
Petesejt oldatok		
OR2	82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM HEPES	
OR2+	OR2 + 1.8 mM CaCl ₂ , 50 µg/ml gentamycin	
Pipetta-/kádoldatok*		****
NaCl	140 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂	P+K
NaG	140 mM Na-glukonát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P+K
NaG_no_Mg	140 mM Na-glukonát	K
NaG_1mM_free_Ca**	140 mM Na-glukonát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂ , 8 mM Ca-(glukonát) ₂	P
KG	140 mM K-glukonát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P+K
NaGm	140 mM Na-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P+K
NaGm_10mM_free_Ca***	140 mM Na-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂ , 30 mM Ca-(glutamát) ₂	P
NaGm_X mM	X mM Na-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂ (X = 35, 70, 280, 560, 1000)	P+K
CaGm ₂ _X mM	X mM Ca-(glutamát) ₂ , 2 mM Mg-(glukonát) ₂ (X = 50, 100)	P
CaCl ₂ _X mM	X mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ (X = 5, 10, 20, 30, 40, 100)	P
MgCl ₂ _X mM	X mM MgCl ₂ (X = 5, 20)	P
MaGm	140 mM Metilamin-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P
DMaGm	140 mM Di-metilamin-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P
TriMaGm	140 mM Tri-metilamin-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P
TetMaGm	140 mM Tetra-metilamin-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P
NMDGGm	140 mM N-metil-D-glukamin-glutamát, 2 mM Mg-(glukonát) ₂	P

- * Pufferként minden oldat tartalmazott 10 mM HEPES-t
Pipettaoldatok: pH 7,4 → az oldatban használt kationnal megtrálva
(X⁺ ~ 4 mM; X²⁺ ~ 2 mM)
Kádoldatok (mindegyik két formában készült: Ca²⁺ kelátor nélkül illetve EGTA-val):
Ca²⁺ kelátor nélküli pH 7,1 → az oldatban használt kationnal megtrálva
(X⁺ ~ 2,6 mM; X²⁺ ~ 1,3 mM)
+1 mM EGTA-t tartalmazó forma pH 7,1 → az oldatban használt kationnal megtrálva
(X⁺ ~ 4,6 mM; X²⁺ ~ 2,3 mM)
- ** Ilyen körülmények között a bemért Ca²⁺-nak ~ 1/8-a szabad
*** Ilyen körülmények között a bemért Ca²⁺-nak ~ 1/3-a szabad
**** Alkalmazás: P: pipettaoldatként; K: kádoldatként

4. táblázat: A célzott mutációk létrehozásához és a plazmid szekvenáltatásához használt oligonukleotid primerek.

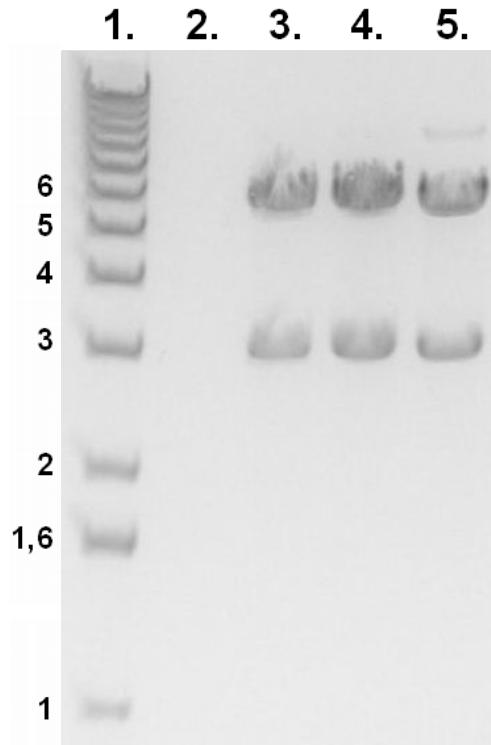
Primer neve	Primer szekvenciája*	Templát
Mutációk*		
G984D-FW	5'-gggcagatcccgggctacatcgacggt-3'	vad típus
G984D-RV	5'-accgtcgatgtagtccgggatctgccc-3'	vad típus
G984D/ Y985E – FW	5'-tcgggcagatcccgggacgagatcgacggtgtgaac-3'	vad típus
G984D/ Y985E – RV	5'-gttcacaccgtcgatctcgtccgggatctgcccga-3'	vad típus
Y985E-FW	5'-ggcagatcccgggcgagatcgacgg-3'	G984D/ Y985E
Y985E –RV	5'-ccgtcgatctcggccgggatctgcc-3'	G984D/ Y985E
T5L-FW	5'-cgggcagatcccgttagacgagatcgacg-3'	G984D/ Y985E
T5L-RV	5'-cgtcgatctcgtctaaagggatctgcccg-3'	G984D/ Y985E
Szekvenálás		**
FW2	5'-gtggaaagtccaactgtctgatgctggg-3'	VK
FW4	5'-gaggagggtggccatcaagatccccatcg-3'	VK
FW5	5'-ccttgctgaaagcctcacggagccaagacc-3'	VK
FW7	5'-gctggcgtggcggaggagtatgagcacag-3'	VK
FW8	5'-cgtggtggtcttcacctgaacatcctctc-3'	TK
FW10	5'-ccaacatcctgctgctcaacctcctcatcg-3'	VK
FW11	5'-cgccatggtggacctgctggacctggacc-3'	VK
FW12	5'-cggcagagaggaaggacgcggccgcatgg-3'	VK
RV2	5'-ggtagatcacgctggagggcgtgtcctggg-3'	VK
RV4	5'-gtgaaggctcaaacatctcctggaagaac-3'	VK
RV6	5'-ccgacggttctggacaatggcccaatgag-3'	VK
RV8	5'-cgccgacgtccagcttattccagaagtcac-3'	VK
RV10	5'-cttctccagcttgttcttgagctgcttg-3'	TK
RV14	5'-cctcgctgatggccaagggtcccaggggc-3'	VK

* Aláhúzás: a lecsereendő aminosav(ak)at kódoló bázishármas(ok)

Piros kiemelés: a mutációhoz megváltoztatandó/inzertálandó nukleinsavak

** TK: tesztelt klónok (pre-screening: több klón vizsgálata, a kívánt pórus mutációt tartalmazó klón kiválasztásához)

VK: végső klón (teljes inzert szekvenálása, egyéb mutációk kizárásához)



7. ábra: TRPM2 mutánsokat tartalmazó plazmidok mennyiségének agaróz gélen történő ellenőrzése.

1. oszlop: DNS létra (Invitrogen 1 Kb DNA Ladder). A csíkok: 1; 1,6; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12 kb nagyságúak (1,6 kb-os csík 100 ng DNS-t tartalmaz)

3-5. oszlopok: EcoR1 és Xba1 restrikciós enzimmal emésztett mutáns TRPM2 csatornát tartalmazó pGEMHE plazmidok (0,5 μ l). A restrikciós enzimek a TRPM2-t kódoló szakaszt hasítják ki a plazmidból. A felső csíkok az 5,6 kb-ból álló TRPM2-t kódoló szakaszok, míg az alsók a ~ 3 kb-os üres pGEMHE plazmidok.

A plazmid mennyisége a DNS létra 1,6 kb-os csíkjának intenzitásával összehasonlítva becsülhető, amelyből a felvitt térfogat ismeretében a plazmidkoncentráció meghatározható.

3.2.2. In vitro cRNS szintézis

A cRNS készítéséhez a plazmidokat Nhe1 restrikciós enzimmel linearizáltuk. Az elvágott DNS tisztítását követően a cRNS szintéziséhez T7 mMessage mMachine kit-et (Applied Biosystems) használtunk. A cRNS mennyiségét denaturáló gél segítségével határoztuk meg és -80°C -os fagyasztóba helyeztük.

3.3. Petesejt preparálása, injektálása

3.3.1. Petesejtek izolálása

A petesejteket sebészileg távolítottuk el afrikai karmosbékákból. A kivett petesejtcsomókat kocsonyás kötőszövet tartja össze, illetve a petesejteket még egy – táplálásukat ellátó – folliculáris sejtréteg is körülveszi. Ezekről a petesejteket, mind az injektáláshoz mind a mérésekhez, meg kell tisztítani. Ehhez 2-es típusú kollagenázt (2 mg/ml) tartalmazó OR2 oldatban (3. táblázat) egy órán keresztül 18°C -on emésztettük őket. A disszociált, tisztított petesejteket OR2+ oldatban (3. táblázat) 18°C -on tároltuk injektálásig, illetve felhasználásig.

3.3.2. Petesejtek kiválasztása

A petesejtek 6 fejlődési stádiumát különíthetjük el. Az első 3 stádiumban lévő petesejtek kicsik, a vegális és animális pólus még nem különül el. A 4. stádiumban már látható a barna animális és a fehér vegális pólus, de az elkülönülés még nem teljes. A nagy – 1,3 mm átmérőjű – V. és VI. stádiumú sejtekben a pólusok már jól definiáltak (150), ezeket a sejteket használtuk fel méréseinkhez.

3.3.3. Petesejtek injektálása

A TRPM2 csatornát kódoló cRNS-t mikroinjektálással juttatjuk be a petesejtekbe. Az izolált petesejteket az injektálás idejére ismét OR2 oldatba helyeztük, majd az animális póluson 10 ng cRNS-t (50 nl térfogatban) injektáltunk a sejtekbe.

Ezután a sejteket OR2+ oldatban, 18°C-on tároltuk. A méréseket 1-3 nappal az injektálás után végeztük.

3.3.4. Petesejtek tisztítása

A mérésekhez a petesejteket a vitellin membrántól is meg kellett tisztítani. Ehhez a sejtet hiperozmoláris oldatba raktuk, amelyben vízvesztés miatt összezsugorodik. A sejhártyától elváló a vitellin membrán, így láthatóvá válik, és sztereomikroszkóp alatt csipeszek segítségével manuálisan eltávolítható. A megtisztított sejtet izotóniás kádoldatban mostuk és a mérőkamra közelében lévő petesejttartó kádba helyeztük.

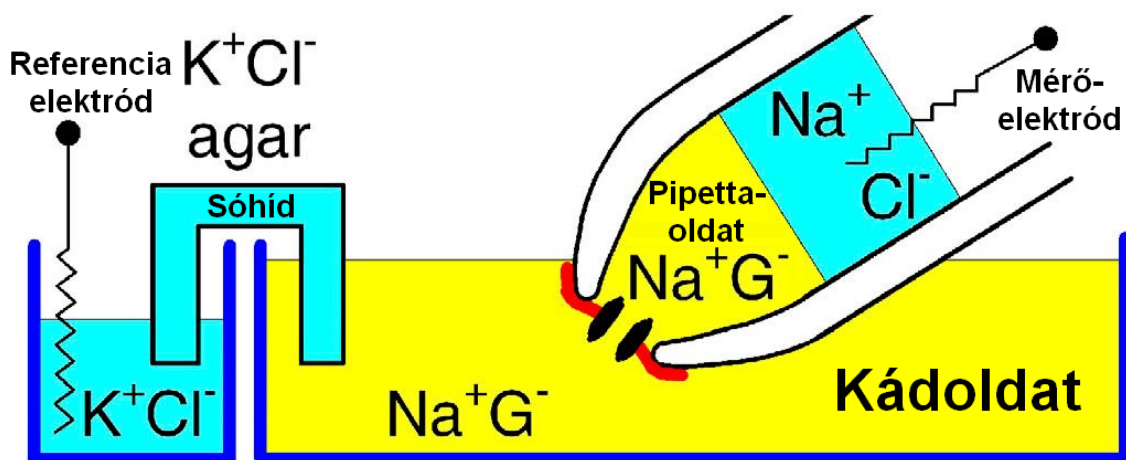
3.4. Izolált membrános inside-out patch clamp mérések

3.4.1. Mérési elrendezés

A méréshez a pipettahegyeket boroszilikát üvegből húztuk, úgy hogy a standard 140 mM Na-glukonátos oldatunkkal töltve ellenállásuk 2-4 M Ω -os legyen. A kísérletek során az 8. ábrán látható elrendezést használtuk. Mivel referencia és mérőelektródnak egyaránt Ag/AgCl elektródot használtunk, ezért ezeket mindenképpen Cl⁻ tartalmú oldatokba kellett helyezni. Annak érdekében, hogy a kádoldatot szabadon cserélhessük a mérés során, a referencia elektródot egy külön – 3 M KCl-t tartalmazó – edénybe helyeztük, és sóhíddal kapcsoltuk a kádhoz. Azokban a mérésekben, ahol glukonát és glutamát alapú pipettaoldatokkal dolgoztunk, a pipettahegyet ezen oldatokkal csak körülbelül 2 cm-ig töltöttük fel, és föléjük izoozmotikus NaCl alapú pipettaoldatot rétegeztünk a mérő elektróda számára.

3.4.2. Szoros tapadás kialakítása, mérés

A patch clamp kádba helyezett megtisztított petesejtet úgy pozicionáltuk, hogy az animális pólus mutasson a pipetta (mérőelektród) felé. A pipetta hegyével, kis pozitív nyomás jelenlétében, megérintettük a petesejt membránját. Ezután a pozitív nyomást megszüntettük, illetve szükség szerint kis negatív nyomást alkalmaztunk, majd



8. ábra: Az izolált membrános inside-out patch clamp mérések során használt elrendezés.

A petesejtmembrán endogén Cl^- csatornáinak zavaró hatását kiküszöbölendő, a legtöbb mérés során glutamát vagy glukonát alapú kád- és pipettaoldatokat használtunk. Ugyanakkor a mérőelektrod számára a pipettaoldat tetejére rétegzett izoozmotikus NaCl , míg a külön edénybe helyezett referencia elektródnak 3 M-os KCl oldat, biztosította a megfelelő ionkörnyezetet. Utóbbi sósóhíddal kapcsoljuk a mérőkádhoz, ami lehetővé tette, hogy a mérés során a kádoldatot szabadon cserélhessük a referencia elektród elektródpotenciáljának megváltoztatása nélkül.

(Csanady, L. and Torocsik, B. 2009, *J. Gen. Physiol* 133, 189-203)

megvártuk, amíg a szoros tapadás kialakul. Ezt követően a pipetta pereme által izolált membránfoltot kiszakítottuk, a mérőkamrába helyeztük, és megkezdjük a mérést. A mérőkamrában a membrán intracelluláris felszínét érő, folyamatosan áramló kádoldat összetételét egy komputer-vezérelt perfúziós rendszer (HEKA) segítségével szabadon és gyorsan (<100 ms) cserélhettük. A méréseket 25°C-on végeztük. Az elektródák közötti áramot Axopatch 200B (Molecular Devices) erősítővel feszültségjellé alakítottuk, és 2kHz-en szűrve, 10 kHz-es mintavételezéssel digitalizáltuk. Az így kapott adatokat Pclamp10 program segítségével számítógépen rögzítettük.

3.4.3. Diffúziós potenciál meghatározása

A petesejtek számára ideális körülmények fenntartása érdekében a petesejttartó – és így a mérés kezdetén a mérőkamra is – standard Na-glukonát oldattal volt feltöltve. Ettől összetételében eltérő pipettaoldat esetében így diffúziós potenciál alakul ki a pipetta- és a kádoldat között. Mivel a referencia és mérőelektród közötti feszültséget a mérés előtt nullázzuk, ez a diffúziós potenciál a patch kiszakítása után a membránpotenciál eltolódásához vezet. Ezért ilyen esetekben az alkalmazott tartófeszültséget utólag korrigáltuk a diffúziós potenciállal, hogy megkapjuk a mérés során membrán a két oldala között ténylegesen fennálló feszültségértéket. Bár a diffúziós potenciál számítással becsülhető is, mi minden pipettaoldathoz méréssel határoztuk meg a pontos értékét. Ennek érdekében kontroll mérések során először kádoldatként is a vizsgált pipettaoldatot alkalmazva nulláztuk a két elektród közötti potenciálkülönbséget, majd a kádoldatot a standard Na-glukonát oldatra cserélve megmértük a kialakuló potenciálkülönbség mértékét: ez megadta az adott pipettaoldatra jellemző diffúziós potenciált.

3.4.4. Adatok kiértékelése

3.4.4.1. Makroszkópos áramok kiértékelése az irrevezibilis inaktiváció figyelembevételével

Az eredmények összehasonlíthatósága végett a különböző fajtájú és koncentrációjú nukleotidok által indukált makroszkópos áram értékét mindig az

ugyanazon patch-ben, ugyanolyan Ca^{2+} koncentráció (15 vagy 125 μM) mellett alkalmazott telítési koncentrációjú (32 μM) ADPR által kiváltott áramhoz (maximális aktiváció) normalizáltuk. A Ca^{2+} koncentráció-függés vizsgálatakor, a teszt $[\text{Ca}^{2+}]$ -k kiváltotta áramot a 125 μM Ca^{2+} jelenlétében mért áramhoz normalizáltuk.

Mivel a kiszakított patch-ben, a csatornák irreverzibilis inaktivációja miatt, a működő vad típusú TRPM2 csatornák száma folyamatosan csökken, a maximálisan aktiválható áram nagyságát egy adott teszt szegmensben 9. ábrán látható módon, lineáris inter- vagy extrapolációval becsültük.

3.4.4.2. Görbeillesztések: Michaelis-Menten, Hill-, és Gauss-egyenlet

A különböző mérési eredményekre a legkisebb négyzetek módszerével illesztettük a görbéket. Az illesztések alapját a következő egyenletek adták:

1. Az egyedi csatorna áramok meghatározásánál a hisztogramok illesztéséhez Gauss-görbék lineáris kombinációját használtuk (lásd 10. A ábra):

$$f(I) = \sum_{i=1}^n a_i \cdot e^{-\frac{(I-b_i)^2}{2 \cdot c_i^2}},$$

ahol I az áramerősség, n az illesztett csúcsok száma, míg a_i , b_i és c_i szabad paraméterek az egyes Gauss görbék amplitúdóját, átlagát, illetve szórását adják.

2. A csatornák vezetőképességének kation koncentráció-függését a Michaelis-Menten egyenletet alkalmazva jellemeztük:

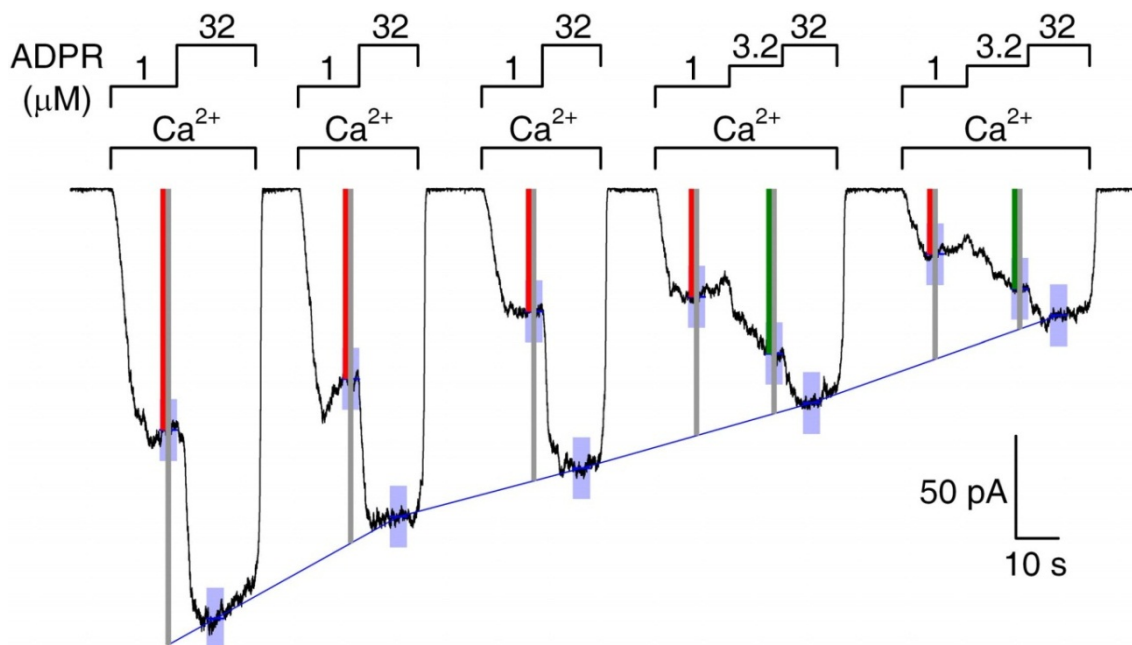
$$g([X^+]) = g_{max} \cdot \frac{[X^+]}{[X^+] + K_{1/2}},$$

ahol $[X^+]$ a vizsgált kation koncentrációja, $g([X^+])$ a csatorna ezen koncentrációnál mért vezetőképessége, g_{max} a csatorna maximális vezetőképessége, míg a $K_{1/2}$ a csatorna látszólagos affinitása a vizsgált kation iránt. Az illesztés során g_{max} és $K_{1/2}$ voltak a szabad paraméterek.

3. A csatornát aktiváló ligandok dózis-hatás összefüggései a Hill-egyenlettel illesztettük:

$$\frac{I([L])}{I_{max}} = \frac{[L]^n}{[L]^n + K^n},$$

ahol $[L]$ a ligand koncentrációja, $\frac{I([L])}{I_{max}}$ a ligand által aktivált áram maximális aktivációhoz normalizált értéke (9. ábra), K a csatorna látszólagos affinitása a ligand



9. ábra: A maximálisan aktiválható TRPM2 áram irreverzibilis inaktiváció miatti csökkenésének korrekciója makroszkópos áramok kiértékelése során

Telítési (125 μM) Ca^{2+} és eltérő ADPR koncentrációk mellett -20 mV-on mért TRPM2 áram. A kék vízszintes vonalak a világoskék téglalapokkal kiemelt szegmensekben az 1, 3,2 és 32 μM ADPR mellett mért áramok átlagát jelölik.

A különböző [ADPR]-k aktiváló hatásának meghatározásához, az 1 és 3,2 μM ADPR mellett mért áramok átlagát (piros, illetve zöld oszlopok), az adott pillanatban maximálisan aktiválható áram becsült értékéhez (szürke oszlopok) normalizáltuk. Mivel izolált membrános mérésekben az aktiválható TRPM2 csatornák száma folyamatosan csökken, a vizsgált időpontban maximálisan elérhető áram nagyságát a teszt szegmens előtt és után alkalmazott telítési koncentrációjú (32 μM) ADPR jelenlétében mért értékek lineáris interpolációjával (kék vonalak) becsültük meg. Amennyiben a vizsgált teszt szegmenst nem előzte meg ilyen "kontroll" szakasz (például az 1 μM ADPR első alkalmazása az ábrán), akkor lineáris extrapolációt használtunk a következő két telítési ADPR mellett mért "kontroll" áramérték felhasználásával.

iránt, míg n a ligandkötőhelyek közötti kooperativitást jellemző Hill-koefficiens. Az illesztés során K és n voltak a szabad paraméterek.

3.4.4.3. Egyedi csatorna áramok és vezetőképesség vizsgálata

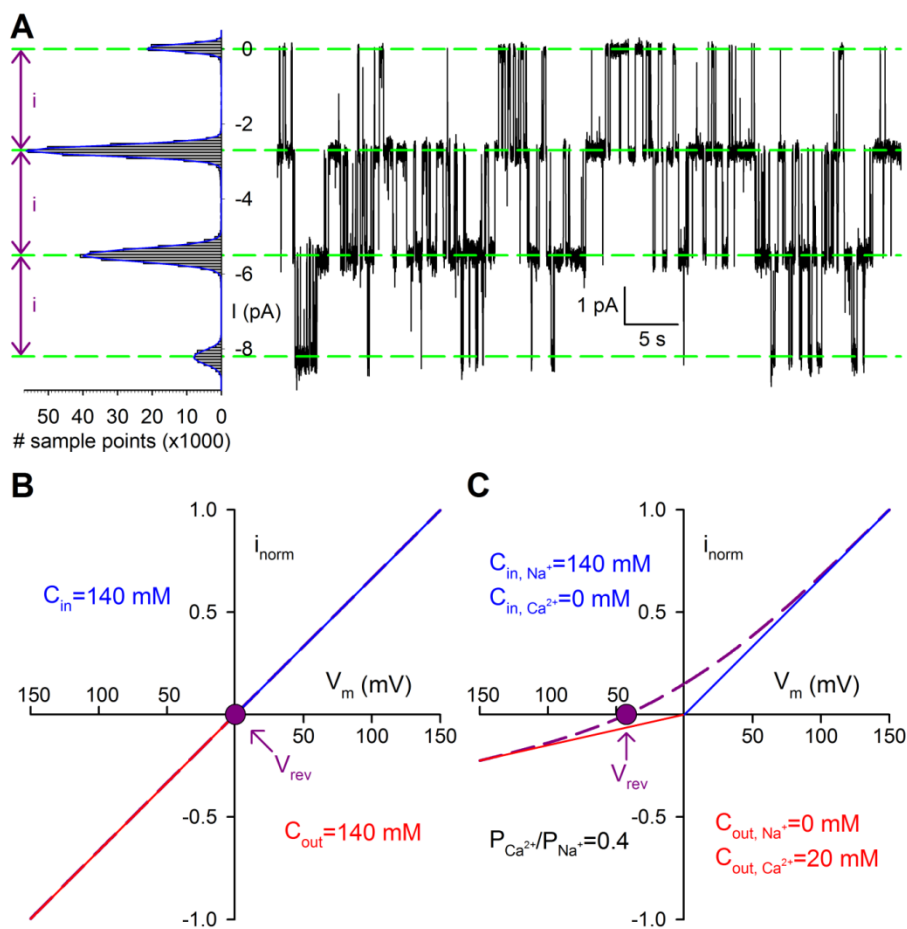
Az egyedi csatornák áramának meghatározásához olyan szakaszokat választottunk, ahol 50 vagy 200 Hz-es szűrést követően 2-4 áram szinthez tartozó egyedi események jól feloldhatóak voltak (10. A ábra). A vizsgált szakaszon előforduló áramerősség tartományt kis intervallumokra osztva hisztogramot készítettünk a regisztrált áramerősség értékek sokaságából, és erre Gauss-görbék súlyozott összegét illesztettük. A görbék csúcsainak távolsága adta meg az egyedi csatornák amplitúdóját (i) az adott feszültségen (10. A ábra). Az így kapott egyedi csatorna áramokat a feszültség (V_m) függvényében ábrázoltuk és ezekből az $i(V_m)$ karakterisztikákból határoztuk meg a csatorna vezetőképességét a vizsgált kation iránt (10. B és C ábra).

A TRPM2 csatornát lineáris áram-feszültség összefüggés jellemzi (52), ezért szimmetrikus elrendezés esetén – azaz, ha a membrán két oldalán azonos típusú és koncentrációjú kationok vannak jelen – a kapott pontokra illesztett egyenes meredeksége megadja a vizsgált kationra jellemző vezetőképességet ("slope conductance") (10. B ábra).

Amennyiben a membrán két oldalán eltérő koncentrációjú vagy típusú kationok vannak jelen, a negatív feszültségeken mért (befelé irányuló) áramot az extracelluláris, míg a pozitív potenciálokon tapasztalt (kifelé folyó) áramot az intracelluláris kation iránti vezetőképesség határozza meg. A reverz potenciál (V_{rev}) környezetében az $i(V)$ karakterisztika meredeksége jelentősen eltérhet a tényleges vezetőképességre jellemző értéktől, de V_{rev} -től távolodva egyre jobban megközelíti azt. Ezért a csatorna vezetőképességét a membrán két oldalán lévő kationok iránt a legnegatívabb, illetve a legpozitívabb feszültséghez tartozó pont és az origót összekötő egyenes meredeksége alapján becsültük meg ("chord conductance") (10. C ábra).

3.4.4.4. Egyedi csatornák steady-state kapuzási kinetikájának elemzése

A vad típusú TRPM2 csatornáról kutatócsoportunk már korábban publikált ilyen elemzéseket, a jelen munkában is az ott leírt módszert használtuk (52). A vizsgálatokat



10. ábra: Az egyedi csatorna áram és vezetőképesség meghatározása.

A, 4 jól elkülönülő áram szintet tartalmazó reprezentatív szakasz, és a belőle készült hisztogram. A hisztogramra illesztett Gauss görbék csúcsainak távolsága adja meg az egyedi csatornák áramát (i).

B, A csatorna vezetőképességének meghatározása, ha a membrán két oldalán található kationok típusa és koncentrációja is azonos. A TRPM2 csatorna árama lineárisan függ a feszültségtől, ezért szimmetrikus körülmények között a csatorna vezetőképességét a -80 és $+80$ mV között mért pontokra illesztett egyenes meredeksége adja. A reverz potenciál (V_{rev}) ilyenkor 0 mV.

C, A csatorna vezetőképességének meghatározása, ha a membrán két oldalán található kationok típusa vagy koncentrációja eltérő. Ilyenkor a csatorna áramát extrém negatív feszültségeken az extracelluláris, extrém pozitív feszültségeken az intracelluláris oldatnak megfelelő vezetőképesség határozza meg. Az $i(V)$ karakterisztika (lila görbe) aszimptotikusan közelíti ezt a két elméleti félegyenest (piros, illetve kék egyenes), azonban a V_{rev} környékén jelentősen eltér ezektől. Ezért ilyen körülmények között a csatorna vezetőképességét a legnegatívabb, illetve a legpozitívabb mérési pontot az origóval összekötő egyenes meredekségével jellemeztük.

telítési (32 μM) ADPR jelenlétében alacsony (4 μM), illetve telítési (125 μM) Ca^{2+} mellett végeztük el.

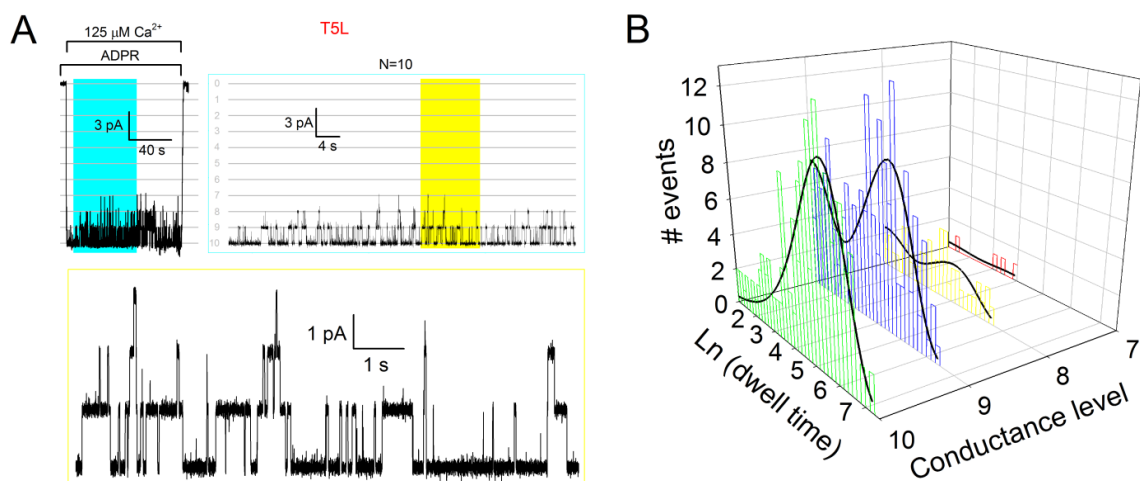
Mindkét ligand telítési koncentrációja mellett olyan méréseket választottunk az elemzéshez, amelyek maximum 10 aktív csatornát tartalmaztak. A mért áramokat alapvonal-korrekciónak, illetve 200 Hz-es szűrés után a félamplitúdó módszer segítségével idealizáltuk (150). Az így kapott eseménylista a két egymást követő kapuzási lépés (nyitás vagy záródás) által határolt elemi események vezetési szintjeinek (l_k), illetve időtartamainak (t_k) rendezett listája ($[l_1;t_1];[l_2;t_2];[l_3;t_3];\dots$). Az idealizálás során 1 ms-os holtidőt használtunk, az ennél rövidebb eseményeket nem vettük figyelembe. Az eseménylistából a következő módszerrel becsültük meg a csatornák nyitvatartási valószínűségét (P_o):

$$P_o = \frac{\sum_k l_k \cdot t_k}{N \cdot T}, [1]$$

ahol N az összes aktiválható csatorna száma, míg a T a teljes mérési szegmens időtartama: $T = \sum_k t_k$.

A részletesebb elemzéshez az eseménylista elemi eseményeinek időtartamaiból vezetési szintenként logaritmusos időskálával hisztogramokat készítettünk (152) (11. B ábra), és e hisztogramok együttesére a "maximum likelihood" módszert alkalmazva (a holtidő figyelembevételével) kapuzási modellt illesztettünk (153). A T5L mutáns a vad típusú csatornához hasonló kapuzási tulajdonságokat mutatott: a nyitott állapotokat rövid – néhány ms-os – és hosszabb – akár néhány s-os – zárt állapotok választották el egymástól. Ez arra utal, hogy a csatornának legalább két eltérő zárt állapota van, ezért az elemzés során a két zárt és egy nyitott állapotot tartalmazó $C_1 \leftrightarrow C_2 \leftrightarrow O_3$ modellt használtuk az adatok illesztésére. A kapott sebességi állandókból (r_{12} , r_{21} , r_{23} , r_{32}) kiszámoltuk az átlagos nyitási és zárási sebességet (k_{co} és k_{oc}). (Az alternatív $C_1 \leftrightarrow O_3 \leftrightarrow C_2$ modell illesztése azonos nyitási és zárási sebességeket eredményezett.)

4 μM szabad Ca^{2+} mellett a csatorna P_o -ja nagyon alacsony, ezért ahhoz, hogy ilyen körülmények között elegendő kapuzási eseményt kapjunk, ezekhez a mérésekhez nagyszámú – néhány száz – csatornát tartalmazó patch-eket használtunk, amelyekben 4 μM Ca^{2+} jelenlétében nem tapasztaltunk egyszerre 10-nél több nyitott csatornát (26. A ábra). A csatornák valós számát (N) a vizsgált szakaszt követően alkalmazott 125 μM Ca^{2+} jelenlétében mért áram alapján becsültük meg. A maximum likelihood illesztésnél feltételeztük, hogy a csatornák száma (N') éppen 10, így a k_{oc} -re jó becslést kaptunk,



11. ábra: Egyedi csatornák steady-state kapuzási kinetikájának elemzése.

A, Az elemzésekhez használt mérések egy tipikus példája (bal felső görbe). Telítési ADPR és Ca^{2+} jelenlétében a csatornák közel 1-es P_o -val kapuznak, így könnyen megállapítható, hogy a patch hány T5L csatornát tartalmaz (itt $N=10$). Az elemzéshez felhasznált, világoskékkel kiemelt szakasz hosszabb időskálán látható a jobb felső ábrán. Az itt sárgával kiemelt szakaszt mutatja tovább nagyítva az alsó ábra: látható, hogy az egyedi csatorna események tisztán feloldhatóak.

B, A színes hisztogramok az A ábrán világoskékkel kiemelt szakasz felső négy vezetési szintjének (7., 8., 9., 10.) tartózkodási-idő eloszlásai (a magas P_o miatt alacsonyabb szinteken nem voltak események). A hisztogramok logaritmikus időskálával készültek (152). A fekete görbéket a $C_1 \leftrightarrow C_2 \leftrightarrow O_3$ kapuzási sémát feltételezve maximum-likelihood módszerrel illesztettük a hisztogramokra. Az illesztés alapján kiszámolhattuk a csatorna átlagos nyitási és zárási sebességét.

de a k_{co} értékét túlbecsültük. A valós nyitási sebességet a következő összefüggések felhasználásával számoltuk ki. Egyrészt

$$N' \cdot P_o' = N \cdot P_o, [2]$$

ahol P_o' -t az [1]-es egyenlet alapján számoltuk feltételezve, hogy a patch N' (azaz 10) csatornát tartalmaz. Másfelől

$$P_o = \frac{k_{co}}{k_{co} + k_{oc}}$$

Ebből P_o -t behelyettesítve a [2]-es egyenletbe rendezés után pontos becslést kaptunk k_{co} -ra is:

$$k_{co} = \frac{k_{oc} \cdot N' \cdot P_o'}{N - N' \cdot P_o'}$$

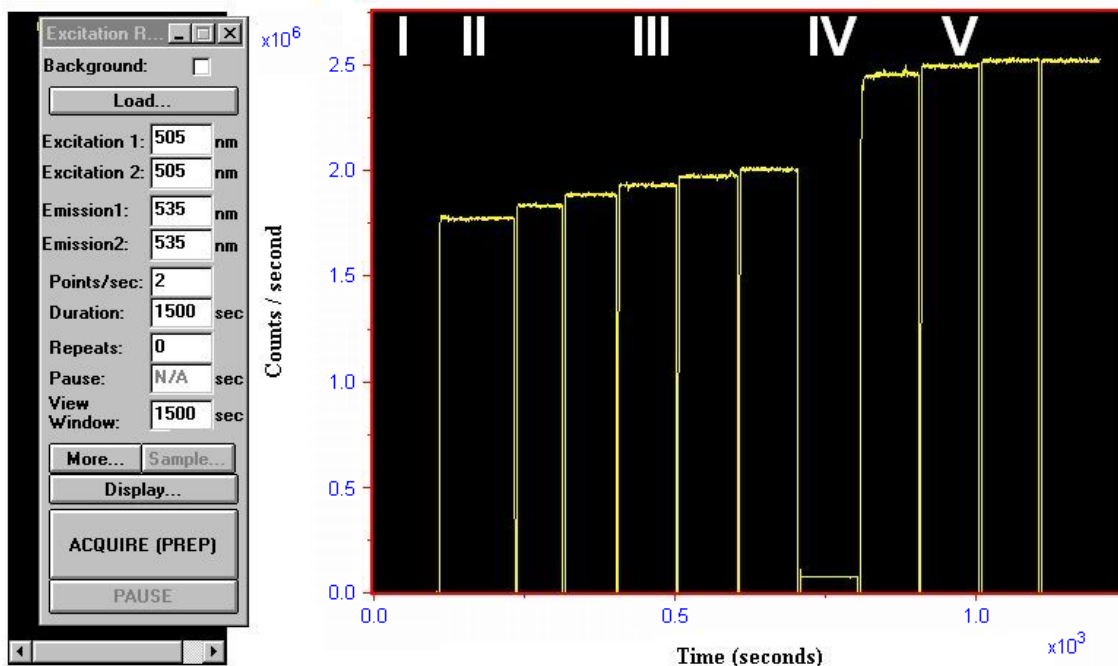
3.5. Fluorimetria, anionok Ca^{2+} affinitásának meghatározása

Az alternatív anionok Ca^{2+} kötő képességének meghatározását EGTA-mentes nátrium alapú kádolatokban Ca-Green 5N fluoreszcens festék segítségével végeztük. A Ca-Green 5N 505 nm-en gerjesztve a szabad Ca^{2+} koncentrációval arányosan 535 nm-en fényt emittál. A mért intenzitás alapján a szabad Ca^{2+} koncentráció a következő tapasztalati képlet alapján számítható:

$$[Ca^{2+}]_f = K_d \left[\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right]^{\frac{1}{n}} [3],$$

ahol $K_d = 24,1 \mu M$ és $n=0,75$ (52), F az adott körülmények között mért fluoreszcencia intenzitás, F_{min} és F_{max} pedig a nulla, illetve a festéket telítő $[Ca^{2+}]$ -khoz tartozó intenzitás értékek.

A kísérlet során a vizsgált anion 140 mM-os oldatát ismert mennyiségű Ca^{2+} adagok sorozatos hozzáadásával megtitráltuk, közben mértük a mintákban a fluoreszcencia intenzitást, majd EGTA, illetve telítési koncentrációjú Ca^{2+} alkalmazásával meghatároztuk a [3]-as egyenlet használatához szükséges F_{min} és F_{max} értékeket (12. ábra). A vizsgált anion Ca^{2+} affinitását a titrálási görbe illesztéséből számítottuk (lásd 4.1.2.).



12. ábra: A fluoreszcens mérések során használt protokoll

I, Ca-Green 5N hozzáadását megelőzően mért háttérzaj (Ennek értékét minden mérési pontból levontuk). **II**, 1 μM Ca-Green 5N hozzáadását követően "0" hozzáadott Ca^{2+} mellett mért érték. **III**, 10-10 μM CaCl_2 hozzáadására fokozatosan növekvő fluoreszcencia intenzitás. **IV**, F_{\min} meghatározása 2,5 mM EGTA hozzáadásával. **V**, F_{\max} meghatározása 3 mM CaCl_2 sorozatos hozzáadásával a telítés eléréséig.

3.6. Vékonyréteg kromatográfia (TLC)

A mérés során használt nukleotidok (cADPR, ADPR, NAADP, NAAD, NAD⁺) törzsoldatainak tisztaságát TLC-vel ellenőriztük (154,155). 10-100 mM-os koncentrációjú oldatok 1-1 µl-ét vittük fel Polygram SIL G/UV₂₅₄ típusú vékonyrétegre, majd a mintákat beszárítottuk és a vékonyréteget futtató-pufferbe – 70 (v/v)% etanol, 30 (v/v)% H₂O, 0,2 M NH₄HCO₃ – helyeztük. A futtatás után a nukleotidokat UV-fénnyel megvilágítva tettük láthatóvá. A különböző molekulákat retenciós faktoruk alapján azonosítottuk.

3.7. A cADPR enzimatiszítás

A cADPR törzsoldatot a jelenlévő ADPR szennyeződéstől I-es típusú nukleotid pirofoszfátáz enzim (P7383, Sigma) alkalmazásával tisztítottuk meg, kisebb módosításokkal követve egy már korábban leírt protokollt (105): 400 µl 2mM cADPR oldathoz hozzáadtunk 1 egységnyi enzimet és 2 mM Mg²⁺ jelenlétében 37°C-on inkubáltuk 60 percig. Ezt követően az – SDS gél alapján körülbelül 24 kDa molekula tömegű – enzimet 3 kDa-os vágópontú filteren (Z629367, Sigma) történő kétszeri átszűréssel távolítottuk el. A szűrletet TLC-vel vizsgálva egyértelműen látható, hogy az enzim a teljes ADPR szennyezést AMP-re és ribóz-5-foszfátra bontotta, míg a cADPR-t gyakorlatilag teljes mértékben visszanyertük (20. A ábra) – a ribóz-5-foszfát nem fluoreszkál UV-fény hatására, ezért nem látható a képen. Emellett funkcionális tesztekben erősítettük meg, hogy a kétszeri szűrés valóban teljes mértékben eltávolítja a tisztításhoz használt enzimet (20. E ábra).

3.8. A H₂O₂ aktivitásának ellenőrzése

A 10 M H₂O₂-t tartalmazó törzsoldatot +4°C-on tároltuk, és aktivitását permanganometria segítségével rendszeresen ellenőriztük. A kísérletek időtartama alatt nem tapasztaltunk aktivitás csökkenést.

4. Eredmények

4.1. A megfelelő anion keresése

4.1.1. Patch clamp mérések

4.1.1.1. Kontroll mérések

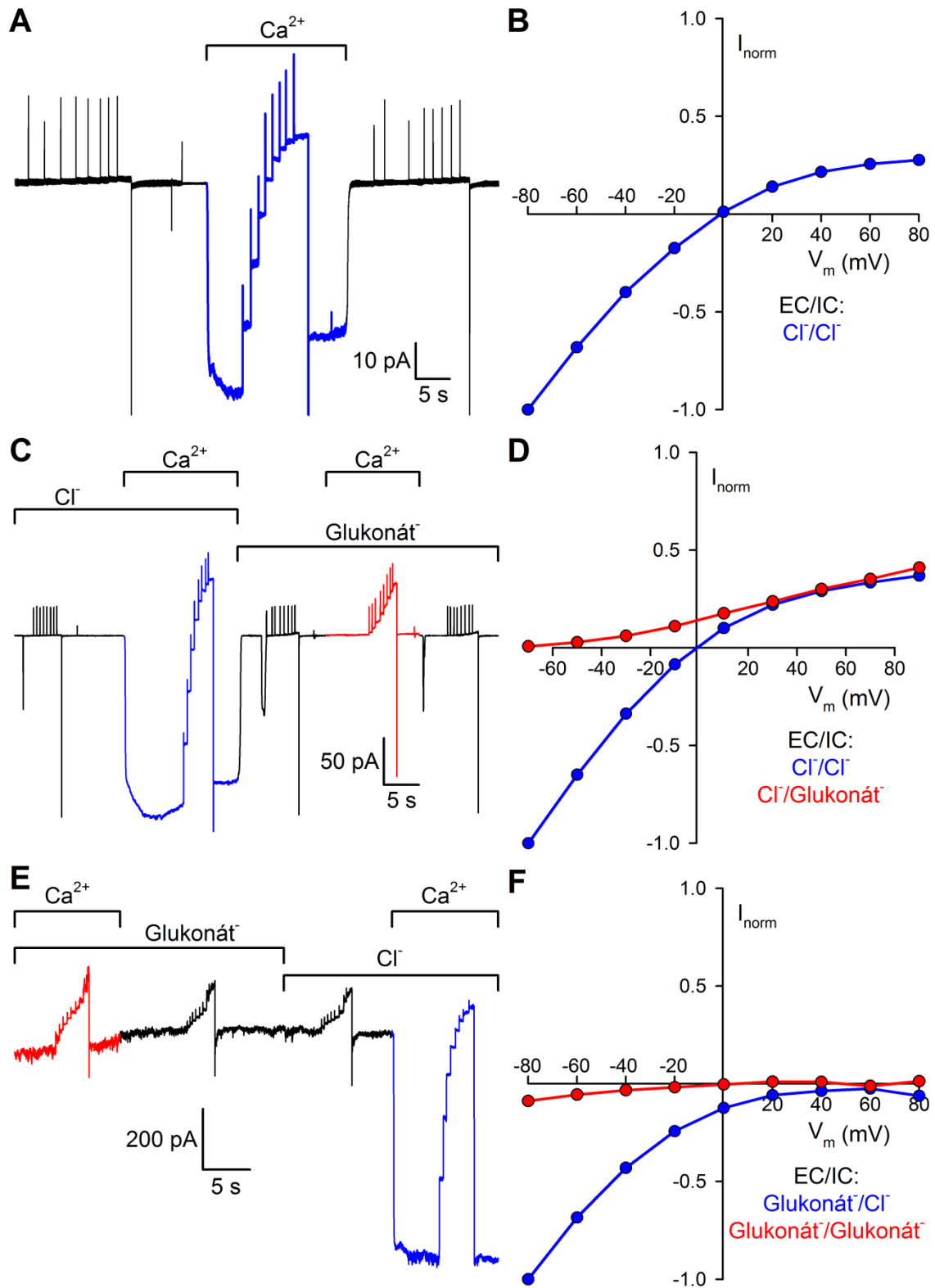
$Cl_{Ca}C$ csatornákra permeábilis anionként Cl^- -ot, míg impermeábilis anionként glukonátot használtunk kontrollként méréseinkhez.

4.1.1.1.1. Cl^- , mint permeábilis anion

E mérések során mind a pipettaoldat mind a kádoldat Cl^- -ot tartalmazott anionként. A $Cl_{Ca}C$ csatornákat Ca^{2+} -ot tartalmazó kádoldat alkalmazásával aktiváltuk. A 13. A ábra egy jellegzetes mérést mutat. E mérés alapján két megállapítást tehetünk. Egyrészt, a TRPM2 csatornákhöz hasonlóan, az aktiválható $Cl_{Ca}C$ áram nagysága sem állandó a mérés alatt, hanem folyamatosan csökken, amit a számításoknál figyelembe kell venni. Másrészt, negatív potenciálokön a befelé irányuló áram (kifelé irányuló Cl^- transzport sebessége) nagyobb, mint a pozitív potenciálokön kifelé irányuló áram (befelé irányuló Cl^- transzport sebessége), vagyis a csatorna befelé rektifikál. Ez jól látszik a 13. B ábrán, amely a Ca^{2+} -aktivált Cl^- áram feszültségfüggését mutatja.

4.1.1.1.2. Glukonát, mint impermeábilis anion

A glukonát a glukóz oxidációjával keletkező, hat szénatomos szerves anion. A glukonátról ismert, hogy nem jut át a $Cl_{Ca}C$ -on (52), ezért ezt az aniont választottuk második kontroll anionnak. Vizsgálatához háromféle mérési elrendezést használtunk. Glukonátos pipettaoldatot Cl^- -os és glukonátos kádoldattal, illetve Cl^- -os pipettaoldatot glukonátos kádoldattal. A jellegzetes mérések a 13. C, E, a kapott áram-feszültség görbék a 13. D, F ábrán láthatók. Ha a pipetta- és kádoldat eltérő volt, akkor az anion transzportot kizárólag a glukonát irányába folyt, míg ha mindkét oldalon glukonát volt, akkor nem folyt áram. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a $Cl_{Ca}C$ -k valóban nem permeábilisak glukonátra.



13. ábra: A $Cl_{Ca}Cl$ vizsgálata: Cl^- , mint permeábilis; glukonát, mint impermeábilis anion. (a részletes leírás a következő oldalon található)

13. ábra: A $Cl_{Ca}Cl$ vizsgálata: Cl^- , mint permeábilis; glukonát, mint impermeábilis anion.

A mérések során a membrán két oldala közötti feszültséget 20 mV-os lépésekben -80 és +80 mV között változtattuk, miközben mértük a membránon keresztülfolyó áramot (**A**, **C** és **E**; a feszültségugrások időpontjait az áramgörbéken megjelenő kapacitív tuskék jelzik). Amennyiben a patchben nincsenek nyitott ioncsatornák, akkor a pipetta és a membrán között létrejövő seal (gigaohmos tapadás) minőségére jellemző kicsi, a feszültegtől lineárisan függő, áram mérhető, amelynek adott feszültségen mért értékével minden mérési pontot korrigáltunk. E módszer segítségével még a gyengébb tapadású patch-ek esetén is szelektíven rekonstruálhatók az ioncsatorna áramok (ld. **E** és **F** panel).

A, **C** és **E**, Nem injektált petesejtekből származó patch-ekben kapott jellegzetes áramgörbék 1 mM citoszólikus Ca^{2+} jelenlétében (kék és piros szakaszok), illetve hiányában (fekete szakaszok), ha a pipettaoldat 140 mM (**A**, **C**) Cl^- -ot, vagy (**E**) glukonátot, a kádoldat pedig 140 mM Cl^- -ot vagy glukonátot (lásd feliratok) tartalmazott anionként. Minden teszt sorozatban (**A**, **E**) -80, illetve (**C**) -70mV-os tartófeszültségről 20 mV-os lépésekkel (**A**, **E**) +80, illetve (**C**) +90 mV-ig növeltük a membránpotenciál értékét, majd visszatértünk a tartófeszültségre. Eközben meghatároztuk az egyes feszültség értékekhez tartozó áramokat. A $Cl_{Ca}C$ -k árama egyetlen feszültségsorozat ideje alatt is jelentősen csökken, ezért a TRPM2 csatornához hasonlóan a mért értékeket ezzel itt is korrigálni kellett.

B, **D** és **F**, Az **A**, **C** és **E** ábrák alapján készült áram-feszültség összefüggések. Az egyes feszültségeken Ca^{2+} jelenlétében mért áramokból levontuk az ugyanazon feszültségen Ca^{2+} hiányában mért áramokat és a különbségeket a Cl^- alapú kádoldatban a legnegatívabb feszültségen meghatározott értékhez (I_{max}) normalizáltuk. A folyamatos inaktiváció miatt az adott pillanatra jellemző I_{max} értéket lineáris interpolációval becsültük. (**B**) Szimmetrikus Cl^- oldattal 0 mV-os V_{rev} mellett, a $Cl_{Ca}C$ csatornára jellemző befelé rektifikáló áramot kaptunk. (**D**) Ha a kádoldat anionként glukonátot tartalmazott, csak kifelé irányuló áramot (befelé irányuló Cl^- transzport) kaptunk (piros görbe). (**F**) Szimmetrikus glukonát oldat elenyésző áramot eredményezett (piros görbe), míg ha a kádoldat anionként Cl^- -ot tartalmazott, csak befelé irányuló áramot (kifelé irányuló Cl^- transzport) kaptunk (kék görbe).

Fluorimetriás mérések alapján a kalcium-glukonát K_d -je ~ 20 mM, vagyis a glukonát jelentős mértékben köti a Ca^{2+} -ot (52), ami a kalcium-glukonát korlátozott oldékonyságával együtt azt eredményezi, hogy nem érhető el vele az általunk kívánt (>30 mM) szabad Ca^{2+} koncentráció.

4.1.1.2. Glutamát, mint alternatív anion

Mivel a $Cl_{Ca}C$ impermeabilis glukonátra, ezért kipróbáltuk a hasonló méretű glutamátot. A glutamát ikerionos szerkezetű 5 szénatomos molekula, amely a glukonátnál jobb oldhatósági tulajdonságokkal rendelkezik. Itt is háromféle elrendezést használtunk. Glutamátos pipettaoldatot Cl^- -os és glutamátos kádoldattal, illetve Cl^- -os pipettaoldatot glutamátos kádoldattal. A tipikus mérések a 14. A, C, a kapott áramfeszültség görbék a 14. B, D ábrán láthatóak. A glukonáthoz hasonlóan, ha az egyik oldalon Cl^- volt jelen, akkor jelentős áramot mérhettünk a membrán két oldala között, azonban ha mindkét oldalon glutamát volt az anion, akkor a $Cl_{Ca}C$ -kon keresztül nem folyt áram. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a $Cl_{Ca}C$ -k glutamátra sem permeabilisak.

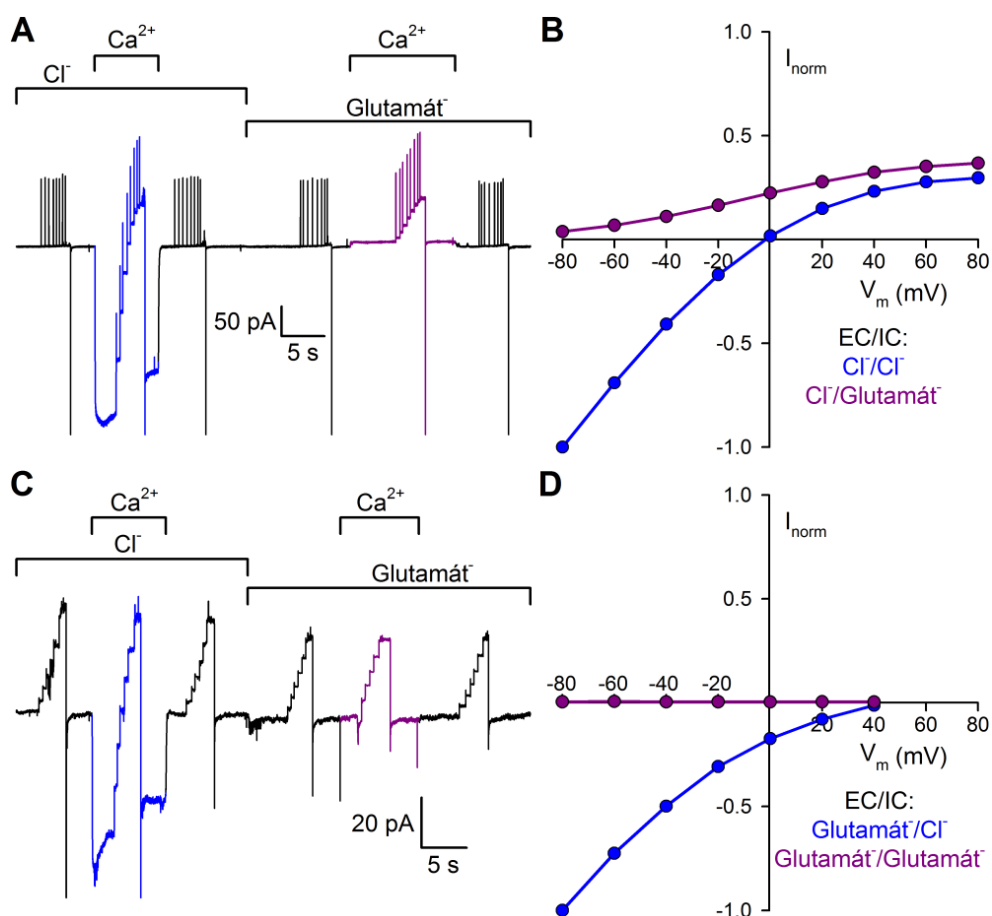
4.1.2. Glutamát Ca^{2+} affinitásának meghatározása fluorimetria segítségével

A Ca-glutamát oldatok szabad Ca^{2+} koncentrációjának meghatározásakor a következő gondolatmenetet követtük: A $Ca(\text{glutamát})_2$ só ionrácsos kristály, amely oldódás közben teljes mértékben ionjaira (Ca^{2+} -ra és glutamát $^-$ -ra) disszociál. Ugyanakkor az oldott glutamát $^-$ ionok és az oldott Ca^{2+} ionok oldatban is kötődhetnek egymáshoz ($Ca\text{-glutamát}^+$), így csökkentve a szabad Ca^{2+} koncentrációt. Utóbbi folyamatot a disszociációs állandójával (K_d) jellemeztük. Ennek számítása:

$$K_d = \frac{[Ca^{2+}]_f \cdot [Gm^-]_f}{[Ca - Gm^+]}$$

ahol az f index a szabad ion koncentrációját jelöli.

Fluorimetriás mérés során a $[Ca^{2+}]_f$ -t mértük, emellett ismertük a hozzáadott Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_a$) és a teljes glutamát koncentrációt ($[Gm^-]_t$). Az oldat szennyeződésként



14. ábra: A Cl_{CaC} vizsgálata: glutamát, mint nem permeábilis anion

A és C, Nem injektált petesejtekből húzott patch-ekben kapott jellegzetes áramgörbék 1 mM Ca^{2+} jelenlétében (kék és lila szakasz), illetve hiányában (fekete szakaszok), ha a pipettaoldat (**A**) Cl^- -ot, illetve (**C**) glutamátot, a kádoldat pedig Cl^- -ot vagy glutamátot tartalmazott anionként (lásd feliratok). Minden tesztsorozatban a -80 mV -os tartó feszültségről 20 mV -os lépésekkel (**A**) $+80 \text{ mV}$ -ig, illetve (**C**) $+40 \text{ mV}$ -ig növeltük a membránpotenciál értékét, majd visszatértünk a -80 mV -os tartófeszültségre. Eközben meghatároztuk az egyes feszültség értékekhez tartozó áramot.

B és D, Az **A** és a **C** ábrák alapján készült áram-feszültség összefüggések. A Ca^{2+} jelenlétében mért áramokból levontuk a Ca^{2+} hiányában mért áramokat és a különbségeket a Cl^- alapú kádoldatban -80 mV -on meghatározott értékhez ($I(-80)$) normalizáltuk. A folyamatos inaktiváció miatt az adott pillanatra jellemző $I(-80)$ értéket lineáris interpolációval becsültük. (**B**) Ha a kádoldat anionként glutamátot tartalmazott, csak kifelé irányuló áramot (befelé irányuló Cl^- transzport) kaptunk (lila görbe). (**D**) Szimmetrikus glutamát oldat semmilyen áramot nem eredményezett (lila görbe), míg ha a kádoldat anionként Cl^- -ot tartalmazott, befelé irányuló áramot (kifelé irányuló Cl^- transzport) kaptunk (kék görbe).

már eleve tartalmazhat némi Ca^{2+} -ot ($[\text{Ca}^{2+}]_0$), ezért a számításoknál ezt is figyelembe kellett vennünk. Ezek alapján:

$$[\text{Ca} - \text{Gm}^+] = [\text{Ca}^{2+}]_a + [\text{Ca}^{2+}]_0 - [\text{Ca}^{2+}]_f$$

$$[\text{Gm}^-]_f = [\text{Gm}^-]_i - ([\text{Ca}^{2+}]_a + [\text{Ca}^{2+}]_0 - [\text{Ca}^{2+}]_f)$$

$$K_d = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_f \cdot ([\text{Gm}^-]_i - ([\text{Ca}^{2+}]_a + [\text{Ca}^{2+}]_0 - [\text{Ca}^{2+}]_f))}{[\text{Ca}^{2+}]_a + [\text{Ca}^{2+}]_0 - [\text{Ca}^{2+}]_f}$$

Ezt $[\text{Ca}^{2+}]_f$ -re rendezve másodfokú egyenletet kapunk:

$$[\text{Ca}^{2+}]_f^2 + [\text{Ca}^{2+}]_f \cdot ([\text{Gm}^-]_i + K_d - [\text{Ca}^{2+}]_a - [\text{Ca}^{2+}]_0) - K_d \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_a + [\text{Ca}^{2+}]_0) = 0$$

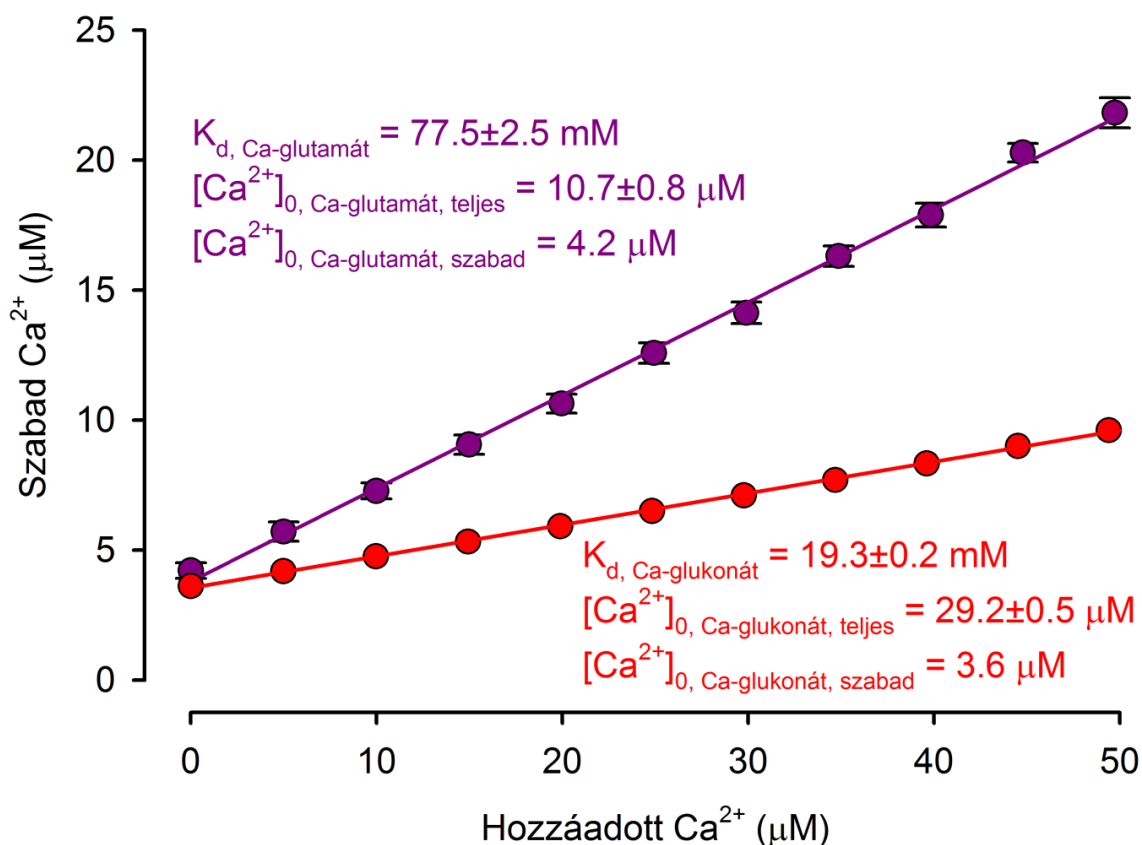
Ennek megoldása [4]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_f = \frac{-([\text{Gm}^-]_i + K_d - [\text{Ca}^{2+}]_a - [\text{Ca}^{2+}]_0) + \sqrt{([\text{Gm}^-]_i + K_d - [\text{Ca}^{2+}]_a - [\text{Ca}^{2+}]_0)^2 + 4 \cdot K_d \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_a + [\text{Ca}^{2+}]_0)}}{2}$$

A mérés során a 140 mM-os Na-glutamát oldathoz 5-10 μM -onként adtunk hozzá CaCl_2 -ot (lásd 12. ábra). A fluoreszcencia intenzitás alapján mindegyik $[\text{Ca}^{2+}]_a$ értékhez meghatároztuk a szabad Ca^{2+} koncentrációt. A mért szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -t a hozzáadott $[\text{Ca}^{2+}]$ -jának függvényében (15. ábra), kalibrációs görbét kaptunk, amelyről a hozzáadott Ca^{2+} függvényében leolvasható az oldat kísérletesen mért szabad Ca^{2+} koncentrációja a 0-20 μM -os tartományban, amely lefedi a TRPM2 legérzékenyebb tartományát (lásd 25. ábra, Ref. (52)). Annak érdekében, hogy szélesebb tartományban is kiszámolhassuk az oldatok szabad Ca^{2+} koncentrációját, a [4]-es egyenlet segítségével görbét illesztettünk a mérési pontokra, miközben a K_d és a $[\text{Ca}^{2+}]_0$ voltak a szabad paraméterek.

Az illesztés alapján a $K_d = 77,5 \pm 2,5$ mM, míg a kiindulási (teljes) Ca^{2+} koncentráció $10,7 \pm 0,8$ μM . A becsült K_d és a [4]-es képlet alapján az általunk alkalmazni kívánt 100 mM-os $\text{Ca}(\text{glutamát})_2$ oldat szabad Ca^{2+} koncentrációja ~ 36 mM, ami már elegendő lehet a TRPM2 csatorna Ca^{2+} permeabilitásának vizsgálatához.

Bár e mérések alapján nem zárhattuk ki, hogy magas (több tíz mM-os) $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál egyéb folyamatok is érvényre jutnak, és így a tényleges szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ eltér az általunk számított értéktől, a csatornák Ca^{2+} vezetőképességének vizsgálatánál a $\text{Ca}(\text{glutamát})_2$ alapú oldatok jelenlétében mért egyedi csatorna áramok nagysága



15. ábra: A Ca-glutamát K_d -jének meghatározása.

A patch clamp méréseknél használt 140 mM-os Na-glutamát alapú kádoldatban a szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -t 25°C-on Ca-Green 5N fluoreszcencia méréssel határoztuk meg, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 és 50 μM Ca^{2+} hozzáadása után. A szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ értékeket a hozzáadott Ca^{2+} függvényében ábrázoltuk (lila pontok). A lila vonalat a [4]-es egyenlet segítségével illesztettük a pontokra. Az illesztés során a szabad paraméterek a K_d és a kádoldatban lévő Ca^{2+} szennyezés mennyisége ($[\text{Ca}^{2+}]_{0, \text{teljes}}$) voltak. Összehasonlításképpen az ábrán feltüntettük a Ca-glukonáttal már korábban publikált görbét (piros). (Csanady, L. and Torocsik, B. 2009, *J. Gen. Physiol* 133, 189-203)

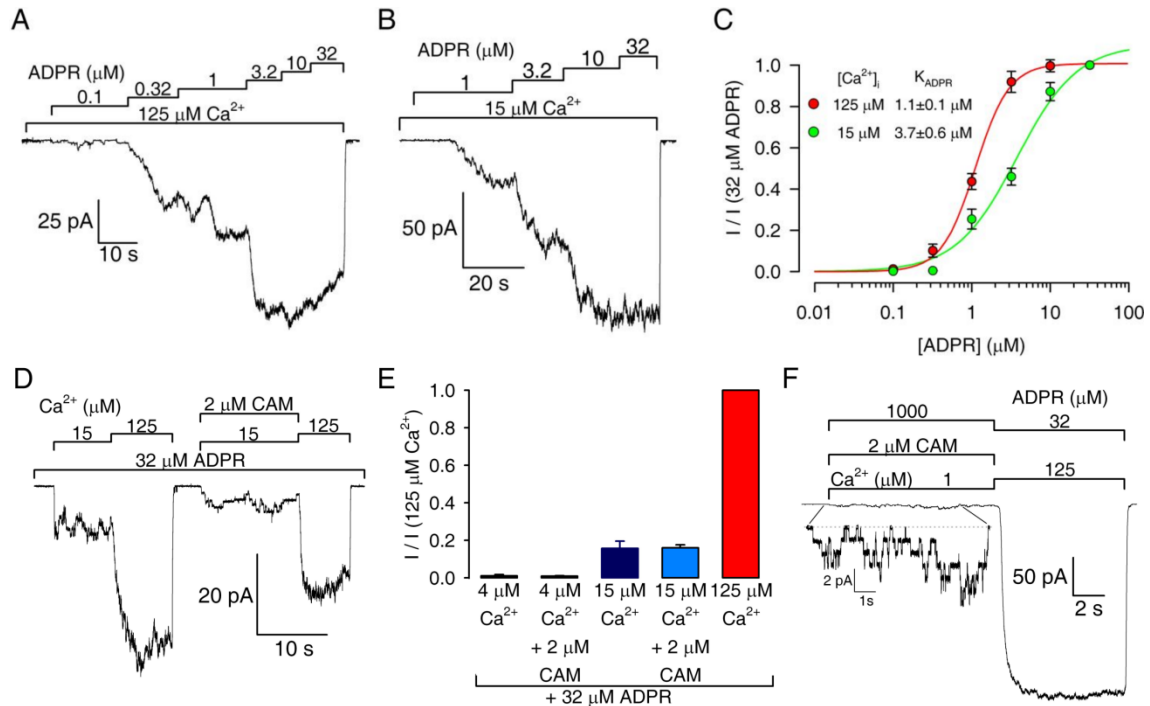
megegyezett a számítottak megfelelő koncentrációjú CaCl_2 alapú oldatok jelenlétében mért értékekkel.

4.2. A TRPM2 csatorna működését befolyásoló molekulák vizsgálata izolált membrános inside-out patch clamp segítségével

4.2.1. Az adenosin-difoszfó-ribóz (ADPR) és a Ca^{2+}

Az egészséjtes (76) és az izolált membrános mérések alapján (52) is egyértelmű, hogy az ADPR a TRPM2 csatorna endogén aktivátora. Azonban annak érdekében, hogy az ADPR-t a többi méréshez referenciaként használhassuk, előbb jellemeznünk kellett a hatását. Későbbi méréseinket telítési ($125 \mu\text{M}$), illetve fél-telítési ($15 \mu\text{M}$) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett végeztük, ezért először azt vizsgáltuk, milyen mértékben függ az ADPR látszólagos affinitása az alkalmazott Ca^{2+} -koncentrációtól. Ehhez több száz csatornát tartalmazó patch-eken végzett makroszkópos mérésekben vizsgáltuk emelkedő koncentrációjú ADPR hatását, $15 \mu\text{M}$ és $125 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett. (16. A és B ábra). Bár az alacsonyabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett a $32 \mu\text{M}$ ADPR-zal aktiválható "maximális" áram nagymértékben csökkent (lásd 16. D ábra), a normalizált ADPR dózis-hatás görbe csak kis mértékben tolódott el (16. C ábra). Az illesztett Hill-egyenlet alapján $125 \mu\text{M}$ Ca^{2+} mellett az ADPR affinitását jellemző félhatásos koncentráció $K_{1/2} = 1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$, míg $15 \mu\text{M}$ Ca^{2+} mellett $K_{1/2} = 3,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Vagyis alacsonyabb Ca^{2+} koncentráció mellett valamivel kisebb a csatorna látszólagos affinitása az ADPR iránt. Ez nem meglepő, hiszen az ADPR aktiváló agonista, ezért várható, hogy a nyitott csatorna jobban köti az ADPR-t; viszont alacsonyabb Ca^{2+} szint mellett a csatornák több időt töltenek el zárt – azaz kisebb affinitású – állapotban. A 16. C ábrán az is látszik, hogy a $32 \mu\text{M}$ ADPR mindkét esetben telítési koncentrációt jelent, ezért a különböző anyagok aktiváló hatását a későbbi mérésekben mindig a $32 \mu\text{M}$ ADPR által ugyanazon patch-ben indukált áramhoz viszonyítottuk.

Korábbi egészséjtes tanulmányokban a csatorna ADPR iránti affinitását szubmikromólos $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett vizsgálták (68,76,95,101,113). Ugyanakkor az izolált membrános mérésekben jóval magasabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t kell alkalmazni (52). Ezt az alacsonyabb Ca^{2+} iránti affinitást magyarázhatja, hogy a membrán kiszakítása során a csatorna elveszíti a nagy affinitású Ca^{2+} kötőhelyet. A legkézenfekvőbb jelölt erre a



16. ábra: Az ADPR, a Ca^{2+} és a kalmodulin hatása a TRPM2 csatornára.

A és B, Tipikus áram görbék **(A)** telítési (125 μM) és **(B)** féltelítési (15 μM) Ca^{2+} jelenlétében növekvő koncentrációjú ADPR-zal perfundált izolált membrános mérésekből.

C, Az ADPR aktiváló hatását jellemző normalizált dózis-hatás összefüggés 125 μM (piros körök) és 15 μM (zöld körök) Ca^{2+} jelenlétében. A színes vonalak a Hill-egyenlettel való illesztést ábrázolják.

D, Reprezentatív mérés a kalmodulin aktiváló hatásának vizsgálatához. Féltelítési (15 μM) Ca^{2+} telítési (125 μM) Ca^{2+} -hoz viszonyított aktiváló hatását hasonlítottuk össze kalmodulin jelenlétében és hiányában (32 μM ADPR mellett).

E, 4 és 15 μM Ca^{2+} relatív aktiváló hatása (32 μM ADPR mellett) önmagában (sötétkék oszlopok), illetve kalmodulin jelenlétében (világoskék oszlopok). A kapott áramokat ugyanazon patchben 125 μM Ca^{2+} -mal kiváltott áramokhoz normalizáltuk (piros oszlop).

F, Tipikus mérés annak vizsgálatára, hogy 1 mM ADPR alkalmazásával csökkenthető-e a TRPM2 aktiválásához szükséges Ca^{2+} mennyisége. Kinagyítva látható az 1 μM Ca^{2+} + 1 mM ADPR mellett tapasztalt néhány csatorna nyitás, ami több száz csatorna nagyon alacsony P_o -val történő kapuzását tükrözi.

kalmodulin volt, amely önmagában erősen köti a Ca^{2+} -ot, és korábbi publikációk igazolták, hogy képes kapcsolódni a TRPM2 csatorna N-terminális részéhez (az "IQ-like" motívumhoz), sőt a csatorna működését is befolyásolja (69,70). Ugyanakkor inside-out patch méréseinkben telítési ADPR és alacsony (4 és 15 μM) Ca^{2+} koncentráció mellett a membrán intracelluláris oldalához közvetlenül hozzáadott 2 μM kalmodulin nem befolyásolta a csatorna aktivitását (16. D és E ábra), annak ellenére, hogy a kötési kísérletekben ennél 100-szor alacsonyabb kalmodulin koncentráció is hatásos volt (69).

Egy másik lehetséges magyarázat az egészsejtes mérések során tapasztalt nagyobb Ca^{2+} iránti affinitásra, hogy azokban a mérésekben magas – több száz mikromólos, esetenként millimólos – ADPR koncentrációt használtak (68,101). Ezért azt is megvizsgáltuk, hogy 1 mM ADPR alkalmazása, csökkenti-e a csatorna izolált patch-ben tapasztalt magas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ iránti igényét. Ahogy az 16. F ábrán látható, 1 μM szabad Ca^{2+} , 2 μM kalmodulin és 1 mM ADPR együttes alkalmazásával valóban megfigyelhető volt néhány csatorna nyitása, azonban az azt követően alkalmazott telítési koncentrációjú Ca^{2+} által aktivált áram nagysága nyilvánvalóvá tette, hogy a patch több száz csatornát tartalmaz, vagyis a mérés elején látott néhány nyitás csak nagyon alacsony P_o -t (0,01) tükröz. Mivel izolált membrános mérésekben a csatorna aktiválásához szükséges magas – több tíz μM -os – citoszólikus Ca^{2+} iránti igényt sem a kalmodulin, sem 1 mM ADPR alkalmazása nem szüntette meg, ezért a különböző modulátorok hatását is csak magas – 15 μM és 125 μM – $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett tudtuk megvizsgálni.

4.2.2. A hidrogén-peroxid (H_2O_2)

A korábbi publikációk alapján nem kétséges, hogy a TRPM2 csatorna szerepet játszik az oxidatív stressz indukált folyamatokban (109,131,143), azonban továbbra sem tisztázott, hogy a H_2O_2 milyen módon aktiválja a TRPM2 csatornát. Az egyik lehetőség, hogy ez közvetlen módon kritikus helyen lévő aminosav oldalláncok oxidálásával történik (97,113), de valószínűbb egy közvetett mechanizmus, például ADPR felszabadítás a PARP/PARG rendszer aktivációján keresztül (95,98,101,112,114).

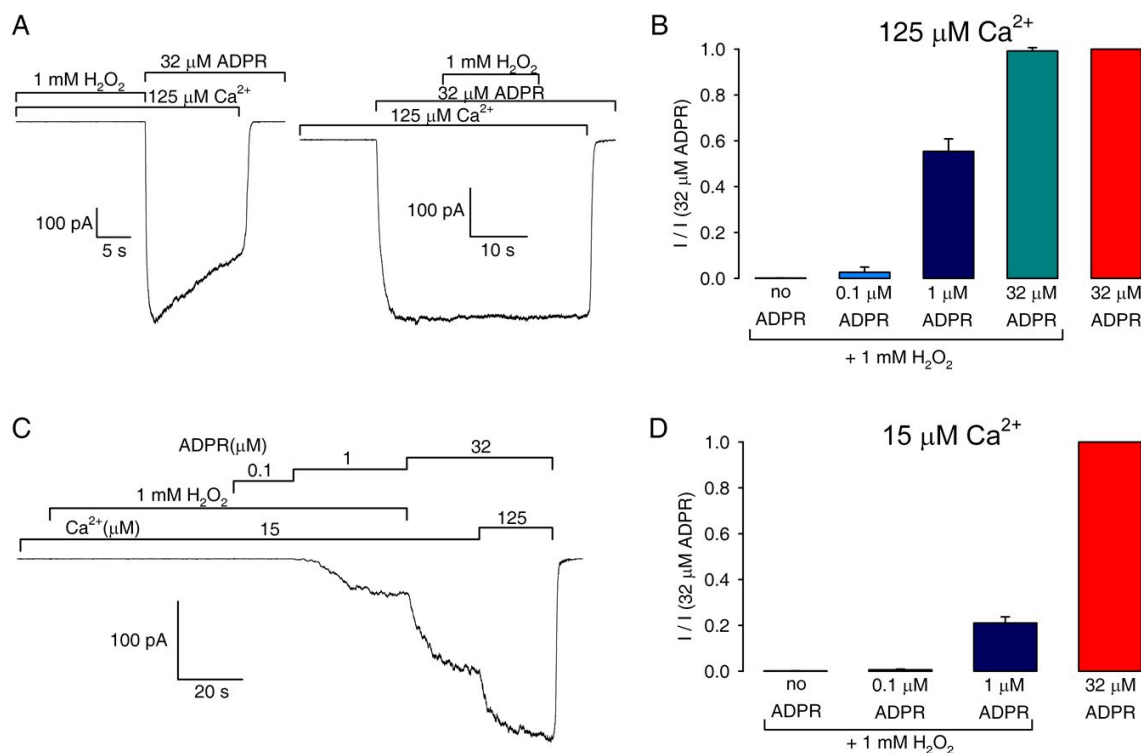
Az általunk is használt izolált membránban a csatorna működése az egyéb intracelluláris komponensek zavaró hatása nélkül vizsgálható, így alkalmazásával ez a kérdés könnyen eldönthető.

Méréseink során először azt vizsgáltuk, hogy telítési $[Ca^{2+}]_i$ (125 μM) jelenlétében a H_2O_2 képes-e aktiválni a TRPM2 csatornát. Ehhez különböző hosszúságú ideig perfundáltuk a patch-et 1 mM H_2O_2 -vel, majd az aktiválható TRPM2 csatorna számának megállapítása érdekében telítési koncentrációjú (32 μM) ADPR-t alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy a H_2O_2 alkalmazása olyan patch-ekben sem vált ki csatorna nyitást, amelyekben az ADPR hatására akár több száz TRPM2 csatorna is aktiválódik (17. A ábra, bal). Vagyis, a H_2O_2 közvetlen módon – citoszólikus aminosavak oxidációja révén – nem aktiválja a TRPM2 csatornát.

Ugyanakkor az ilyen mérések nem adnak támpontot arra nézve, hogy a H_2O_2 esetlen nem gátolja-e oldalláncok módosítása révén a csatorna működését. Ezért telítési koncentrációjú ADPR jelenlétében is megvizsgáltuk a H_2O_2 hatását. Megállapítottuk, hogy a H_2O_2 nem befolyásolja az ADPR-zal kiváltott áramot (17. A ábra, jobb).

Néhány egészséjtes méréseken alapuló tanulmány szerint a H_2O_2 fokozza az ADPR aktiváló hatását (101,104). Ezért megvizsgáltuk, hogy 1 mM H_2O_2 jelenléte befolyásolja-e, a 0,1 μM vagy 1 μM ADPR által kiváltott áram nagyságát. H_2O_2 jelenlétében a 0,1 μM ADPR a maximális áram $2,6 \pm 2,3$ %-át ($n = 7$), míg 1 μM ADPR 55 ± 6 %-át ($n = 7$) aktiválta (17. B ábra, világoskék és sötétkék oszlop). Tehát az ADPR $K_{1/2}$ értéke H_2O_2 jelenlétében is 1 μM körül van (17. B ábra), vagyis a H_2O_2 nem befolyásolta a csatorna ADPR iránti affinitását. Tehát a H_2O_2 – legalábbis telítési $[Ca^{2+}]_i$ jelenlétében – nincs hatással az ADPR indukálta áramra.

Korábbi méréseink (16. C ábra) azt mutatták, hogy ha csak kis mértékben is, de az $[Ca^{2+}]_i$ befolyásolja az ADPR iránti látszólagos affinitást. Felvetődött, hogy a H_2O_2 esetleg a Ca^{2+} -mal analóg módon hat, ezért a jelenlévő telítési koncentrációjú Ca^{2+} elfedi hatását. Ezért méréseinket megismételtük fél-telítési (15 μM) $[Ca^{2+}]_i$ mellett is (17. C és D ábra). Azonban a H_2O_2 önmagában ilyen körülmények között sem aktiválta a TRPM2 csatornákat, illetve a 16. C ábrával összehasonlítva megállapítható, hogy az ADPR iránti affinitást sem befolyásolta.



17. ábra: A H₂O₂ hatása a TRPM2 csatornára.

A, Reprezentatív áram görbék telítési Ca²⁺ jelenlétében 1 mM H₂O₂-dal perfundált izolált membrános mérésekből. (Bal) 1 mM H₂O₂ még telítési koncentrációjú Ca²⁺ mellett sem aktivál áramot, ugyanakkor 32 μM ADPR jelentős, ~700 nyitott TRPM2 pórust tükröző, áramot indukál. A TRPM2-re jellemző irreverzibilis inaktivációt figyelembe véve a H₂O₂ perfúziója idején az aktiválható csatornák száma még ennél is nagyobb lehetett. (Jobb) Telítési koncentrációjú Ca²⁺ mellett 1 mM H₂O₂ alkalmazása nem befolyásolja a 32 μM ADPR által kiváltott TRPM2 áramot.

B, 0, 0,1, 1 és 32 μM ADPR relatív aktiváló hatása 125 μM Ca²⁺ és 1 mM H₂O₂ jelenlétében. Az áramokat a 125 μM Ca²⁺ és 32 μM ADPR jelenlétében mért áramhoz normalizáltuk.

C, Tipikus áramgörbe féltelítési koncentrációjú Ca²⁺ és 1 mM H₂O₂ jelenlétében növekvő koncentrációjú ADPR-zal perfundált izolált membrános mérésekből.

D, 0, 0,1 és 1 μM ADPR relatív aktiváló hatása 15 μM Ca²⁺ és 1 mM H₂O₂ jelenlétében. Az áramokat a 15 μM Ca²⁺ és 32 μM ADPR jelenlétében mért áramhoz normalizáltuk.

Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a H_2O_2 vagy nem oxidálja a TRPM2 csatorna citoszólikus felszínén található aminosavak oldalláncait, vagy pedig ezek oxidációja nem befolyásolja a csatorna működését.

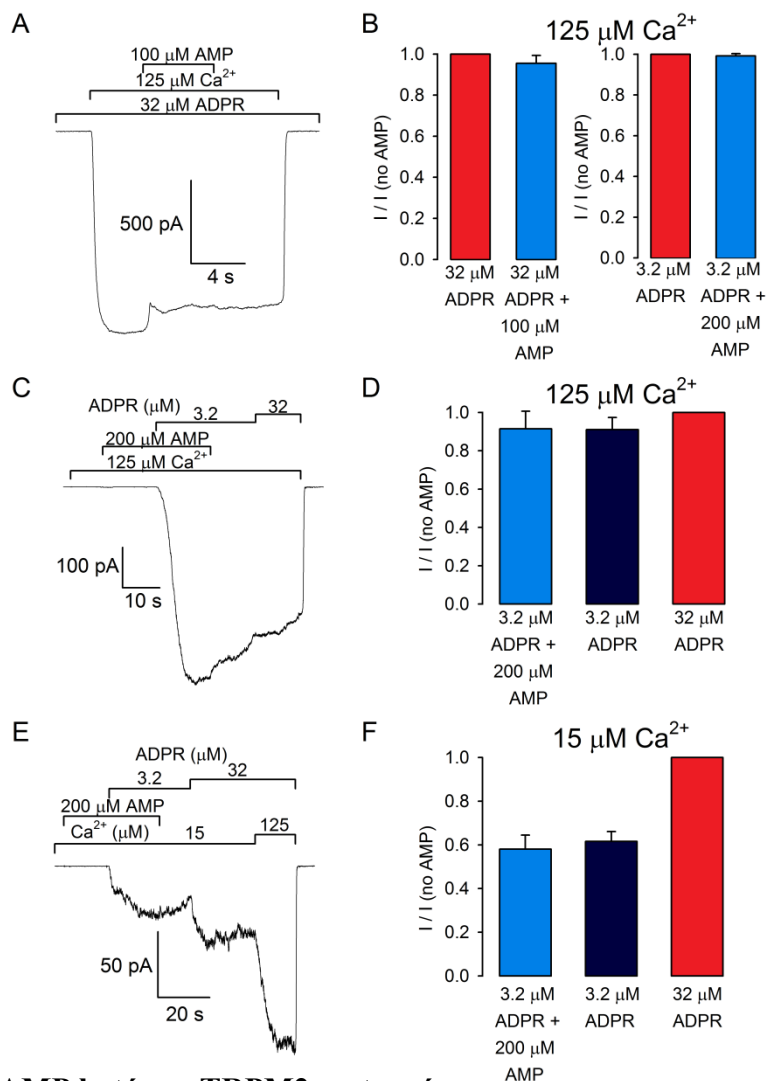
4.2.3. Az adenosin-monofoszfát (AMP)

Az egészséjtes mérések során egymásnak ellentmondó eredmények születtek az AMP hatását illetően. Egyes szerzők szerint az AMP gátolja (101,101,104), mások szerint nem befolyásolja a TRPM2 csatorna működését (105). A gátló hatás közvetlen volta mellett szól, hogy az AMP az ADPR lebomlási terméke, ezért a NUDT9-H doménhez kötődve kompetitív gátlószerként viselkedhet (76,93). Ugyanakkor az eredmények sejttípusfüggése miatt a közvetett hatás sem zárható ki.

Az AMP fiziológiás koncentrációja néhány száz μM -os nagyságrendbe esik (156), ezért mi is ebben a tartományban vizsgáltuk hatását. Az 18. A ábra egy tipikus mérést mutat. Meglepetésünkre, telítési ADPR ($32 \mu\text{M}$) és Ca^{2+} ($125 \mu\text{M}$) jelenlétében a $100 \mu\text{M}$ AMP nem befolyásolta a csatorna működését: az AMP jelenlétében mért áram az AMP hiányában mért érték $95 \pm 4\%$ -a volt ($n = 6$), (18. B ábra, bal oldali diagram).

Feltételezve, hogy az AMP kompetitív gátlószerként viselkedik, a gátlás hiányát értelmezhetjük úgy is, hogy ilyen magas ADPR koncentráció mellett az AMP nem volt képes leszorítani az ADPR-t a ligand kötő helyekről. Ezt támasztja alá, hogy egy újabb egészséjtes tanulmány szerint (104) alacsony ADPR koncentráció mellett a csatorna AMP iránti látszólagos affinitása nagyobb. Ezért méréseinket megismételtük úgy, hogy az ADPR koncentrációját a tizedére ($3,2 \mu\text{M}$) csökkentettük, az AMP-ét pedig megkétszereztük ($200 \mu\text{M}$). Azonban az AMP így sem befolyásolta az ADPR hatását: az AMP jelenlétében mért áram az AMP hiányában kapott érték $99 \pm 1\%$ -a volt ($n = 19$), (18. B ábra, jobb oldali diagram).

Fenti méréseink során az AMP-t viszonylag rövid ideig alkalmaztuk, AMP-mentes szakaszokkal keretezve kontrollként, hogy minimalizáljuk a csatorna inaktivációjának eredményt torzító hatását (18. A ábra). Ugyanakkor, mivel nem ismert, hogy az ADPR milyen kinetikával disszociál kötőhelyeiről, elképzelhető, hogy ez a rövid expozíciós idő nem elegendő ahhoz, hogy az AMP leszoríthassa a már előzetesen ADPR-zal töltött kötőhelyekről a primer ligandot. Ezért kipróbáltunk egy másik protokollt is: a patch-et $200 \mu\text{M}$ AMP-vel előinkubáltuk, és csak ezután adtuk hozzá



18. ábra: Az AMP hatása a TRPM2 csatornára.

A, Telítési koncentrációjú Ca^{2+} és ADPR jelenlétében alkalmazott 100 μM AMP hatását illusztráló tipikus áramgörbe izolált membrános mérésekből.

B, Az A-ban bemutatott kísérleti protokollal végzett mérések összegzése. Az ADPR által AMP jelenlétében aktivált TRPM2 áramot (világoskék oszlop) a körülvevő AMP-mentes kontroll szakaszok áramához (piros oszlop) normalizáltuk. Az alkalmazott koncentrációk az oszlopok alatt vannak feltüntetve.

C és E, Alternatív protokollal készült jellegzetes mérések: 200 μM AMP-vel történő előkezelést követően hasonlítottuk össze 3,2 μM ADPR-nak AMP jelenlétében, illetve hiányában tapasztalt aktiváló hatását. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 125 μM (**C**), illetve 15 μM (**E**) volt.

D és F, A **C** és **E** panelnek megfelelő protokollal végzett mérések összegzése. 200 μM AMP-vel történő előinkubálás után alkalmazott 3,2 μM ADPR kiváltotta relatív áramok az AMP fenntartott jelenlétében (világoskék oszlopok), illetve az AMP elmosása után (sötétkék oszlopok). Az áramok a kísérlet végén alkalmazott 32 μM ADPR kiváltotta áramhoz (piros oszlopok) vannak normalizálva. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 125 μM (**D**), illetve 15 μM (**F**) volt.

3,2 μM ADPR-t (18. C ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a jelenlévő AMP nem akadályozza meg az ADPR aktiváló hatását, és az áram az AMP elvonását követően sem nő tovább. A kiértékelés során az inaktiváció miatt bekövetkező aktiválható csatornaszám csökkenést a 3.4.4.1. fejezetben leírtak szerint korrigáltuk. Elemzésünk alapján 3,2 μM ADPR önmagában a maximális áram $91,1 \pm 6,3$ %-át ($n = 6$), míg 200 μM AMP jelenlétében $91,5 \pm 9,0$ %-át ($n = 6$) váltotta ki (18. D ábra). Vagyis az AMP előinkubáció sem gátolta az ADPR hatását.

Végül megvizsgáltuk azt a lehetőséget is, hogy az AMP esetleges gátló hatását a telítési koncentrációban alkalmazott Ca^{2+} elfedi. Ezért fenti kísérleteinket fél-telítési (15 μM) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett is megismételtük (18. E ábra). Azonban az AMP előinkubáció ilyen körülmények között sem akadályozta meg 3,2 μM ADPR aktiváló hatását, és az áram az AMP elvonása után sem emelkedett tovább. Méréseink alapján 3,2 μM ADPR önmagában a telítési (32 μM) ADPR kiváltotta áram $61,6 \pm 4,5$ %-át ($n = 13$), míg 200 μM AMP jelenlétében $58,1 \pm 6,4$ %-át ($n = 11$) aktiválta (18. F ábra).

Összegezve megállapíthatjuk, hogy az AMP egészszejtes mérésekben tapasztalt gátló hatása nem a TRPM2 csatorna közvetlen gátlását tükrözi.

4.2.4. A ciklikus adenzin-difoszfo-ribóz (cADPR)

A cADPR jól ismert másodlagos hírvivő molekula, amely a II-es és III-as típusú rianodin receptoron keresztül Ca^{2+} -ot mobilizál az intracelluláris raktárakból. (33,41,42,120). Bár a cADPR az ADPR-hoz hasonlóan NAD^+ -ból képződik, a cADPR esetén a nikotinamid lehasítása után N1-glikozidos kötés alakul ki az adenin gyűrű 1-es pozíciójú nitrogénje és a disztális ribóz között, ciklikus molekulát eredményezve (2. ábra) (15).

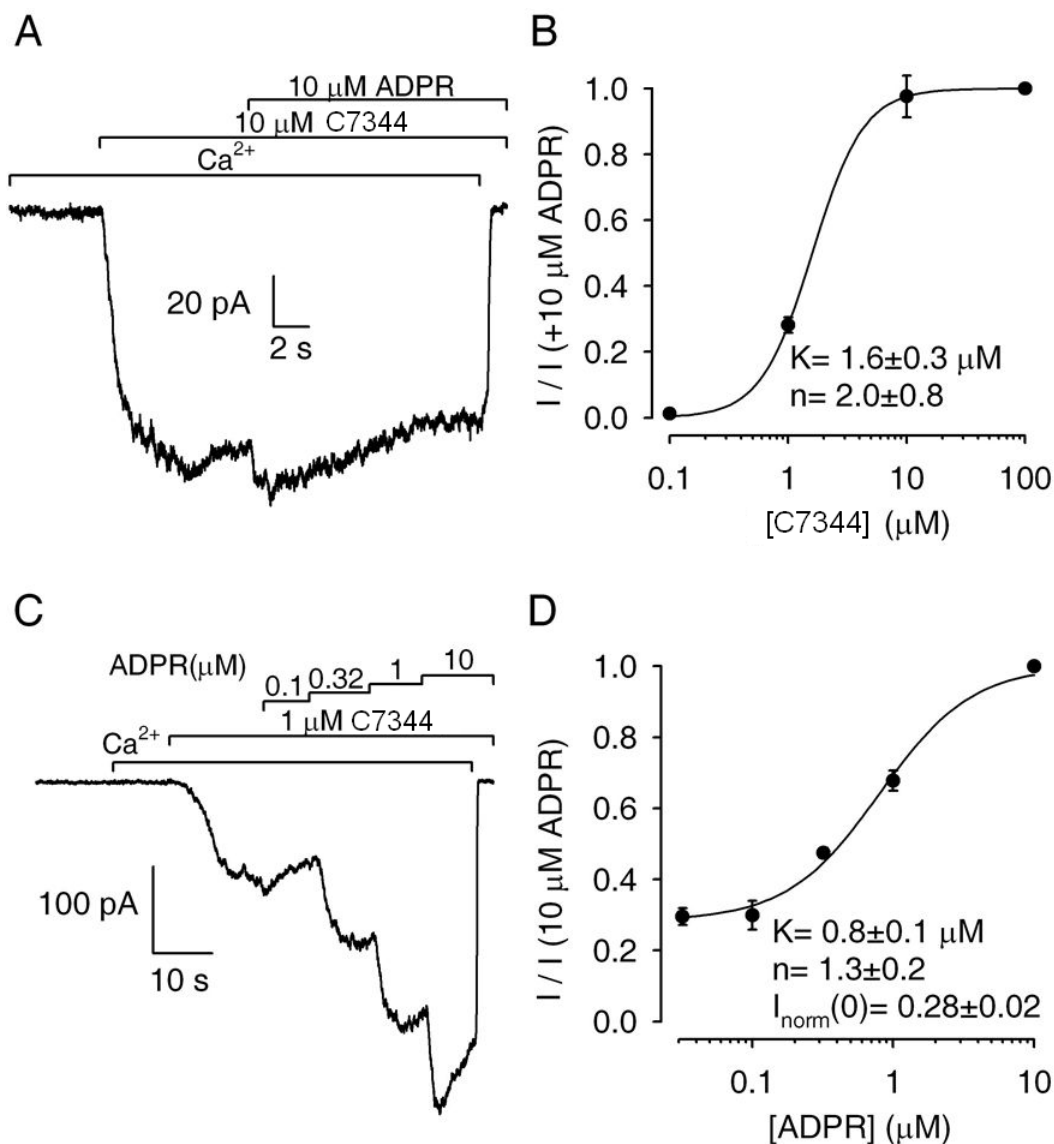
4.2.4.1. A kereskedelmi forgalomban kapható cADPR vizsgálata

Egészszejtes mérések alapján a cADPR önmagában képes aktiválni a TRPM2 csatornákat, emellett már kis koncentrációban is drámaian fokozza az ADPR iránti affinitást is (102,104,119). Kíváncsiak voltunk, hogy ezek az eredmények izolált membrános mérésekben is reprodukálhatók-e. Először telítési Ca^{2+} mellett vizsgálva 10

μM cADPR hatását jelentős áramot kaptunk, amelyet $10 \mu\text{M}$ – közel telítési koncentrációjú – ADPR már csak minimális mértékben fokozott (19. A ábra). $0,1 \mu\text{M}$ és $1 \mu\text{M}$ cADPR már jóval kevésbé volt hatékony. A cADPR normalizált dózis-hatás görbéjének (19. B ábra) Hill-egyenlettel történő illesztése alapján a cADPR $K_{1/2}$ -e $1,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$, ami az ADPR $K_{1/2}$ értékének körülbelül kétszerese. Ezután megvizsgáltuk, hogy a két molekula közötti szinergia is kimutatható-e izolált membrános mérésekben. Ehhez telítési Ca^{2+} és $1 \mu\text{M}$ rögzített [cADPR] mellett vizsgáltuk emelkedő koncentrációjú ADPR aktiváló hatását (19. C ábra). $1 \mu\text{M}$ cADPR önmagában körülbelül a maximális áram 30%-át aktiválta, amit az ADPR dózisfüggő módon tovább növelt. Az $1 \mu\text{M}$ cADPR jelenlétében mért normalizált ADPR dózis-hatás görbe Hill-egyenlettel (+ konstans taggal) történő illesztése (19. D ábra) az ADPR $K_{1/2}$ -ére $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ -t eredményezett, ami alig különbözik az ADPR önmagában történő alkalmazása során mért félhatásos koncentrációjától ($1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Vagyis, a cADPR nem növelte szignifikánsan az ADPR iránti látszólagos affinitást. Az a tény, hogy a cADPR önmagában hatékony aktivátornak mutatkozott, viszont nem szinergizált az ADPR-zal, felvetette annak lehetőségét, hogy a cADPR hatása esetleg a mintában jelenlévő ADPR szennyeződésnek köszönhető. Egy nemrég megjelent tanulmányban (105) szintén erre a következtetésre jutottak, ezért cADPR mintánkat (Sigma C7344) elküldtük tömegspektrometriás analízisre, amely közel 50%-nyi ADPR szennyezést mutatott ki! Ez tökéletesen magyarázhatja a $K_{1/2}$ -re kapott körülbelül kétszeres értéket az ADPR-éhoz viszonyítva (19. B ábra).

4.2.4.2. A cADPR törzsoldat tisztítása

Annak érdekében, hogy a cADPR saját hatását vizsgálhassuk, a mintát meg kellett tisztítanunk az ADPR szennyezéstől. Ehhez egy már közölt protokollt használtunk (105): cADPR törzsoldatunkat nukleotid pirofoszfáttal (P7383, Sigma) kezeltük, amely az ADPR-t AMP-re és ribóz-5-foszfátra (ribóz-5-P) bontja, de érintetlenül hagyja a cADPR-t, majd az enzimet egy szűrő segítségével távolítottuk el az oldatból. Az esetleges artefaktok kiküszöbölése végett a folyamat sikerességét három szempontból is ellenőriztük.



19. ábra: A tisztítatlan cADPR hatása a TRPM2 csatornára.

A, Reprezentatív áramgörbe: telítési Ca^{2+} mellett 10 μM cADPR (Sigma C7344) jelentős áramot produkál, amelyet 10 μM ADPR hozzáadása csak kismértékben fokoz.

B, A tisztítatlan cADPR (Sigma C7344) normalizált dózis-hatás görbéje. A cADPR $K_{1/2}$ értéke ~2-szer nagyobb, mint az ADPR-é azonos körülmények között.

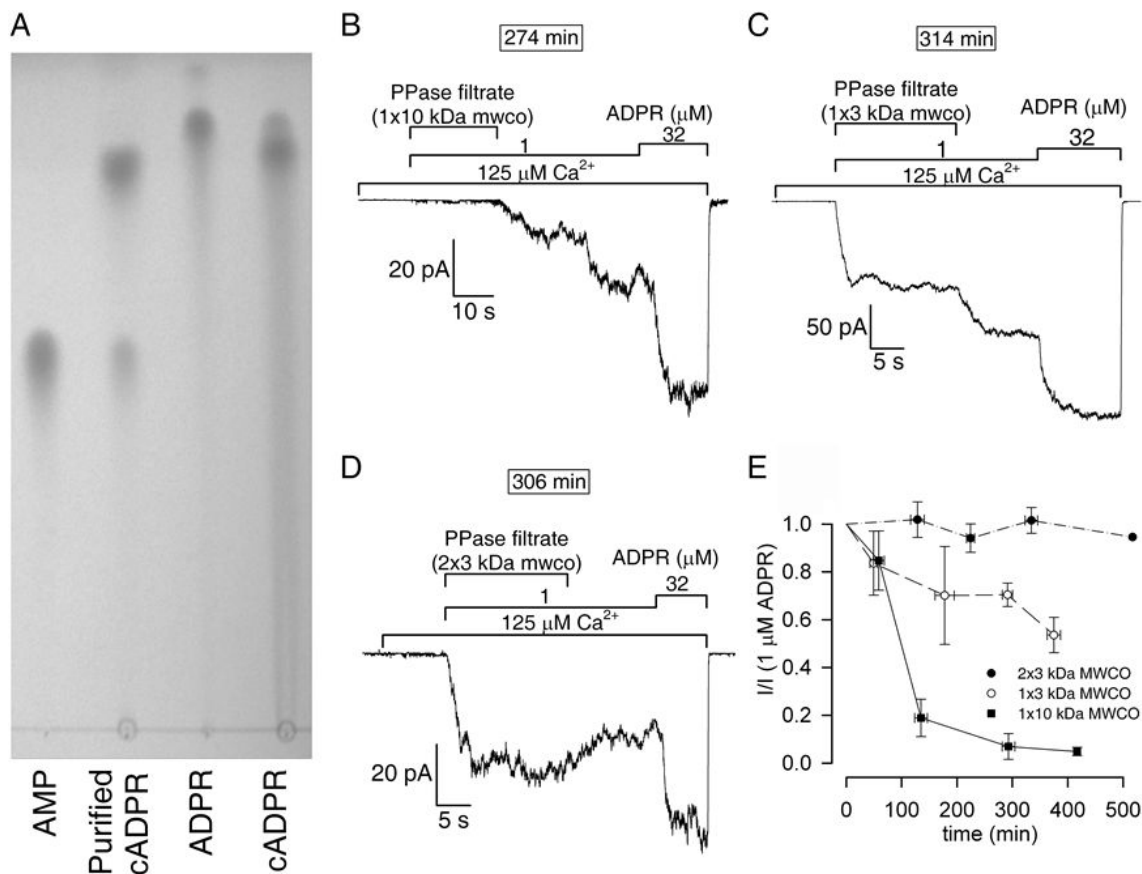
C, Tipikus áramgörbe telítési Ca^{2+} és 1 μM cADPR (Sigma C7344) jelenlétében növekvő koncentrációjú ADPR-zal perfundált izolált membrános mérésekből.

D, Az ADPR 1 μM cADPR (Sigma C7344) jelenlétében mért normalizált dózis-hatás összefüggése. Az 1 μM cADPR jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan az ADPR látszólagos affinitását.

Először az enzimátikus emésztés hatékonyságát vizsgáltuk vékonyréteg kromatográfiával (TLC) (20. A ábra). A vékonyrétegen megfuttatva a tisztítatlan cADPR esetében két körülírt foltot kaptunk, amelyek közül a gyorsabb együtt vándorolt a kontrollként felvitt ADPR-zal és denzitása alapján mennyisége körülbelül a minta 20%-ára volt tehető. Ezzel szemben a megtisztított cADPR esetében eltűnt az ADPR-nak megfelelő folt, és helyette egy új, lassabban migráló folt jelent meg, amely az AMP-vel együtt vándorolt, denzitása pedig a kezeltlen minta ADPR szennyezésének denzitásával volt összemérhető. Ez az eredmény egyrészt megerősítette, hogy az enzimátikus kezelés hatékonyan hasítja az ADPR-t, másrészt igazolta, hogy az enzim nem bontja le a cADPR-t, mivel a kezelt és kezeltlen mintában ennek denzitása nem változott. A másik hasítási termék, a ribóz-5-P, azért nem látható a TLC-n, mert nem fluoreszkál a megjelenítéshez használt UV fény hatására.

Másodszor, számolnunk kell azzal, hogy tisztított cADPR oldatunk AMP-t és ribóz-5-P-ot is tartalmaz. A TLC alapján becsülve a tisztított cADPR 10 μM koncentrációjú oldatában 2-5 μM AMP, illetve ribóz-5-P található. Ezért megvizsgáltuk, hogy e két lebontási termék befolyásolja-e a TRPM2 csatorna kapuzását. Azonban e kontroll kísérletekben sem 100 μM AMP, sem 100 μM ribóz-5-P külön-külön, illetve együttesen történő alkalmazása nem befolyásolta 1, illetve 32 μM ADPR aktiváló hatását telítési Ca^{2+} mellett.

Végül, bár a 24 kDa-os enzim eltávolítására Heiner és mtsai által javasolt (105) 10 kDa-os vágópontú szűrőoszlop megfelelő választásnak tűnt, funkcionálisan is igazolni akartuk e kritikus lépés hatékonyságát. Kísérleteinkben ugyanis a szinergia vizsgálatához szeretnénk volna együtt alkalmazni a tisztított cADPR-t és az ADPR-t. Amennyiben azonban a cADPR törzsoldatban marad enzimátikus aktivitás, akkor az a mindkét nukleotidot tartalmazó oldatokban az ADPR lassú degradációjához vezethet, s így látszólagos gátlást okozhat. Mivel a TRPM2 csatorna aktivitása az ADPR koncentrációra az 1 μM -os koncentráció környékén a legérzékenyebb, ezért 1 μM -os ADPR oldatok aktiváló hatásának időbeli monitorozása segítségével határoztuk meg a maradék pirofoszfátáz aktivitást. Először átszűrtünk a 10 kDa-os szűrőoszlopon az enzimből annyit, amennyit egy csomag cADPR tisztításához is felhasználtunk. Majd az 1 μM ADPR-t tartalmazó kádoldatunkhoz hozzáadtunk a szűrletből egy akkora térfogatot, amely a hasonlóképpen átszűrt tisztított cADPR törzsoldat esetén 10 μM -os



20. ábra: A cADPR tisztítási eljárás vizsgálata.

A, TLC kép (balról jobbra) AMP, enzimatikusan tisztított cADPR, ADPR, nem kezelt cADPR. Látható, hogy az enzimatikusan tisztított cADPR mintából eltűnt az ADPR szennyezés, és helyette megjelent egy AMP-nek megfelelő folt.

B-D, Nominálisan 1 μM ADPR aktiváló hatása különböző nukleotid pirofoszfátáz szűrletek jelenlétében, illetve hiányában (125 μM Ca^{2+} mellett). A **B** és **C** mérésben alkalmazott szűrlet elkészítéséhez 10-kDa, illetve 3-kDa vágópontú (MWCO) szűrőoszlopot használtunk, a **D** méréshez használt szűrletet pedig kétszer engedték át 3-kDa vágópontú szűrőoszlopon. A bekeretezett időmegjelölések a szűrlet testoldathoz történt hozzáadása és a mérés kezdete között eltelt időt jelzik.

E, Az 1 μM ADPR-t, 125 μM Ca^{2+} -ot és nukleotid pirofoszfátáz szűrletet tartalmazó testoldatok által aktivált áramok a testoldat összemérése és a mérés kezdete között eltelt idő függvényében. Az egyes görbék a különböző protokollokkal készült szűrletekkel kapott eredményt mutatják: fekete négyzetek, 1x szűrés 10-kDa vágópontú szűrővel; fehér körök 1x szűrés 3-kDa vágópontú szűrővel; fekete körök, 2x szűrés 3-kDa vágópontú szűrővel.

végkoncentrációt eredményezett volna. Az így kapott tesztoldat és az 1 μM "kezeletlen" ADPR oldat által aktivált TRPM2 áramot hasonlítottuk össze izolált membrános mérésekben, a tesztoldat elkészítése után különböző időpontokban. Meglepetésünkre, a tesztoldat TRPM2 áramot aktiváló képessége 2-3 órával a szűrlet hozzáadása után rohamosan csökkent, majd teljesen megszűnt. A 20. B ábra egy tipikus mérést mutat körülbelül 3 és fél órával a tesztoldat összemérése után. Látható, hogy a szűrlettel kiegészített ADPR tesztoldat ekkor már csak néhány csatornát aktivált, még a "kezeletlen" ADPR-t tartalmazó oldat jelentős áramot adott. A tesztoldat aktiváló képességének ez az időfüggő csökkenése (20. E ábra, fekete négyzetek) arra utalt, hogy a szűrletben maradt pirofoszfátáz aktivitás, ami fokozatosan lebontja az ADPR-t a tesztoldatban. A szennyeződésként visszamaradó enzim mennyiségének csökkentése céljából egy másik, hasonló adag pirofoszfátázt 3 kDa-os vágópontú szűrőoszlopon szűrtünk át, majd hasonlóképpen teszteltük ezt a szűrletet is. A 20. C ábrán bemutatott mérés több mint 5 órával e szűrletet tartalmazó tesztoldat összemérése után készült, ez az oldat mégis jelentős TRPM2 áramot aktivált. Bár az ADPR tesztoldat aktiváló hatásának időfüggő csökkenése ebben az esetben is kimutatható volt, a csökkenés sebessége lényegesen mérséklődött (20. E ábra, fehér körök). Végül egy harmadik, azonos adag enzimet egymás után két 3 kDa-os vágópontú szűrőoszlopon szűrtünk át. Ezt a szűrletet 1 μM ADPR-hoz hozzáadva, még 9 óra elteltével sem tapasztaltunk csökkenést a tesztoldat TRPM2-t aktiváló képességében (20. D ábra, 20. E ábra, fekete körök). Vagyis, ezzel a tisztítási protokollal a teljes enzimaktivitás eltávolítható az oldatból.

Ezek az eredmények a következőkről győzték meg minket: a pirofoszfátáz valóban lebontja a cADPR törzsoldatban levő ADPR szennyezést; a keletkező bomlás termékek nem befolyásolják a TRPM2 csatorna működését; az oldat az enzimtől is megtisztítható két 3 kDa-os vágópontú szűrőoszlop segítségével. A biztonság kedvéért azokban a mérésekben, ahol a tisztított cADPR-t és az ADPR-t együtt alkalmaztuk, az oldatot mindig a cADPR hozzáadása után 3 órán belül használtuk fel.

4.2.4.3. A tisztított cADPR vizsgálata

Korábbi kísérleteinkkel (19. A ábra) ellentétben a tisztított cADPR 10 μM -os koncentrációban alkalmazva, telítési Ca^{2+} mellett, még azokban a patch-ekben sem

aktivált csatornákat, amelyekben a közvetlenül utána alkalmazott telítési ADPR hatására több száz pA-es áramot kaptunk (21. A ábra). Ezután az ADPR és cADPR közötti esetleges szinergia meglétét vizsgáltuk meg: azonban 10 μM tisztított cADPR 0,1 illetve 1 μM ADPR mellé adva nem növelte meg ezek TRPM2 aktiváló hatását (21. B és C ábra). A tisztított cADPR hatástalanságát nem a telítési Ca^{2+} jelenléte okozta, mert méréseinket 15 μM – féltelítési – Ca^{2+} mellett megismételve a tisztított cADPR szintén nem aktivált (21. D és F ábra), és nem is befolyásolta 0,1 illetve 1 μM ADPR hatását (21. E és F ábra).

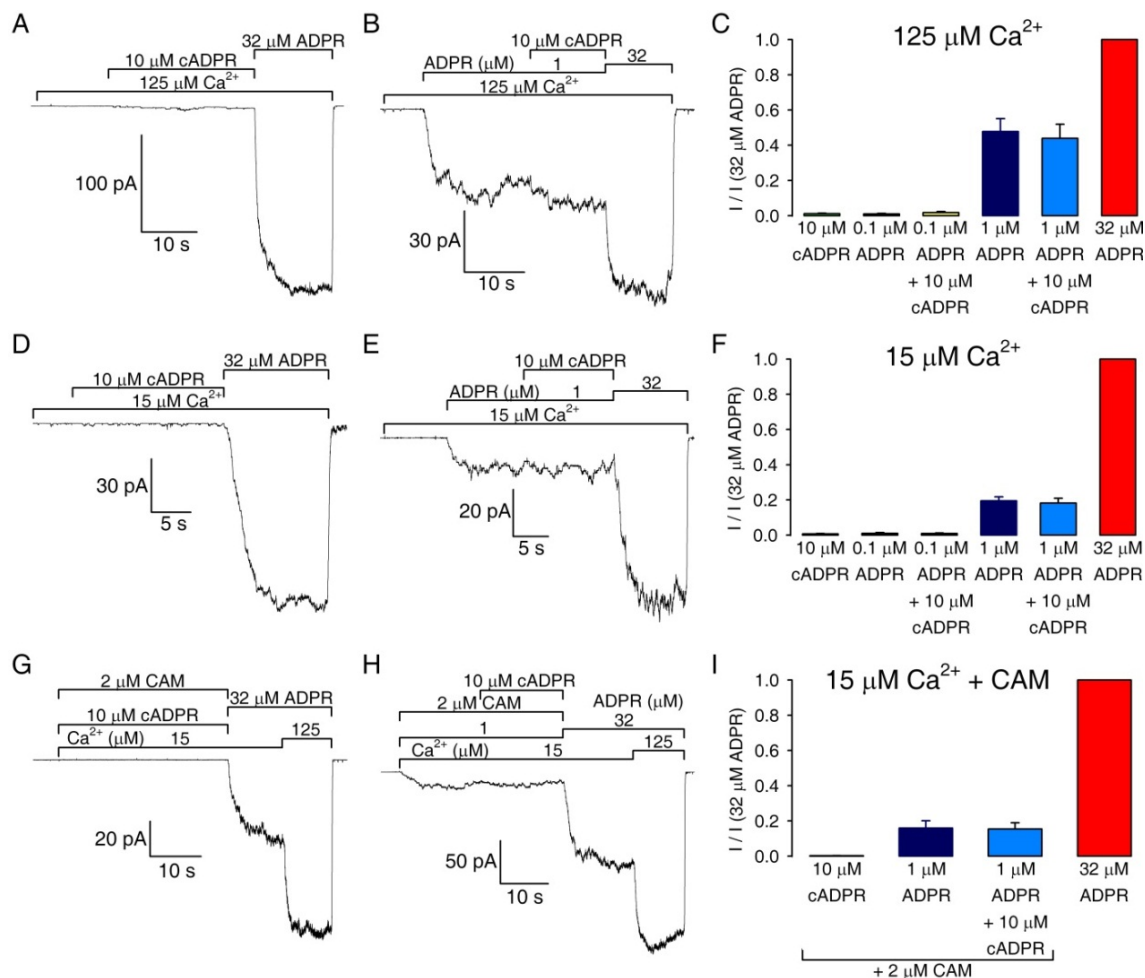
Elvileg elképzelhető, hogy izolált membrános méréseinkben a tisztított cADPR-nak azért nem volt semmilyen hatása, mert a membránfolt kiszakításakor valamilyen celluláris faktor elvész, amelyre a "közvetlen" cADPR hatáshoz szükség lenne. Ilyen komponens lehetne a kalmodulin, amelyről már korábban leírták, hogy szerepe van a TRPM2 csatorna szabályozásában (69,70). Ezért kipróbáltuk, hogy a kalmodulin jelenléte helyreállítja-e a mi rendszerünkben a cADPR egészszejtes mérések során tapasztalt hatásait. Azonban féltelítési Ca^{2+} és 2 μM kalmodulin jelenlétében sem találtuk nyomát a cADPR aktiváló (21. G és I ábra), vagy ADPR aktivitást fokozó (21. H és I ábra) hatásának.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy a tiszta cADPR inside-out patch-ben – közvetlen módon – nem aktiválja a TRPM2 csatornát, és nem befolyásolja az ADPR aktiváló képességét sem, függetlenül az alkalmazott Ca^{2+} koncentrációtól vagy a kalmodulin jelenlététől.

4.2.5. A nikotonsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP)

Az NAADP cADPR-hoz hasonlóan széleskörűen vizsgált intracelluláris Ca^{2+} mobilizáló molekula, amely a bafilomycin-szenzitív lizoszómális rendszerben található TPC csatornákon keresztül fejt ki hatását (27,47,48,157).

Az NAADP az ADPR-hoz szerkezetileg hasonló lineáris molekula (2. ábra). Sajátossága, hogy nem-nukleozid ribózának 2-es pozíciójű szénatomjához egy foszfátesoport, míg a disztális ribóz glikozidos szénatomjához nikotinsav kapcsolódik (15,21). E szerkezeti eltérések ellenére az egészszejtes mérések alapján úgy tűnik, hogy az NAADP képes aktiválni a TRPM2 csatornákat (102,104). Azonban miután az



21. ábra: A tisztított cADPR hatása a TRPM2 csatornára.

A, B, D, E, G és H, Tipikus áramgörbék telítési (125 μM) Ca^{2+} (**A, B**), féltelítési (15 μM) Ca^{2+} (**D, E**), illetve féltelítési (15 μM) Ca^{2+} + 2 μM kalmodulin (**G, H**) jelenlétében végzett izolált membrános mérésekből. (**A, D, G**) 10 μM tisztított cADPR* nem aktivált TRPM2 áramot, pedig az utána alkalmazott 32 μM ADPR mindhárom esetben jelentős áramot produkált. (**B, E, H**) 10 μM tisztított cADPR* nem fokozta 1 μM ADPR aktiváló hatását.

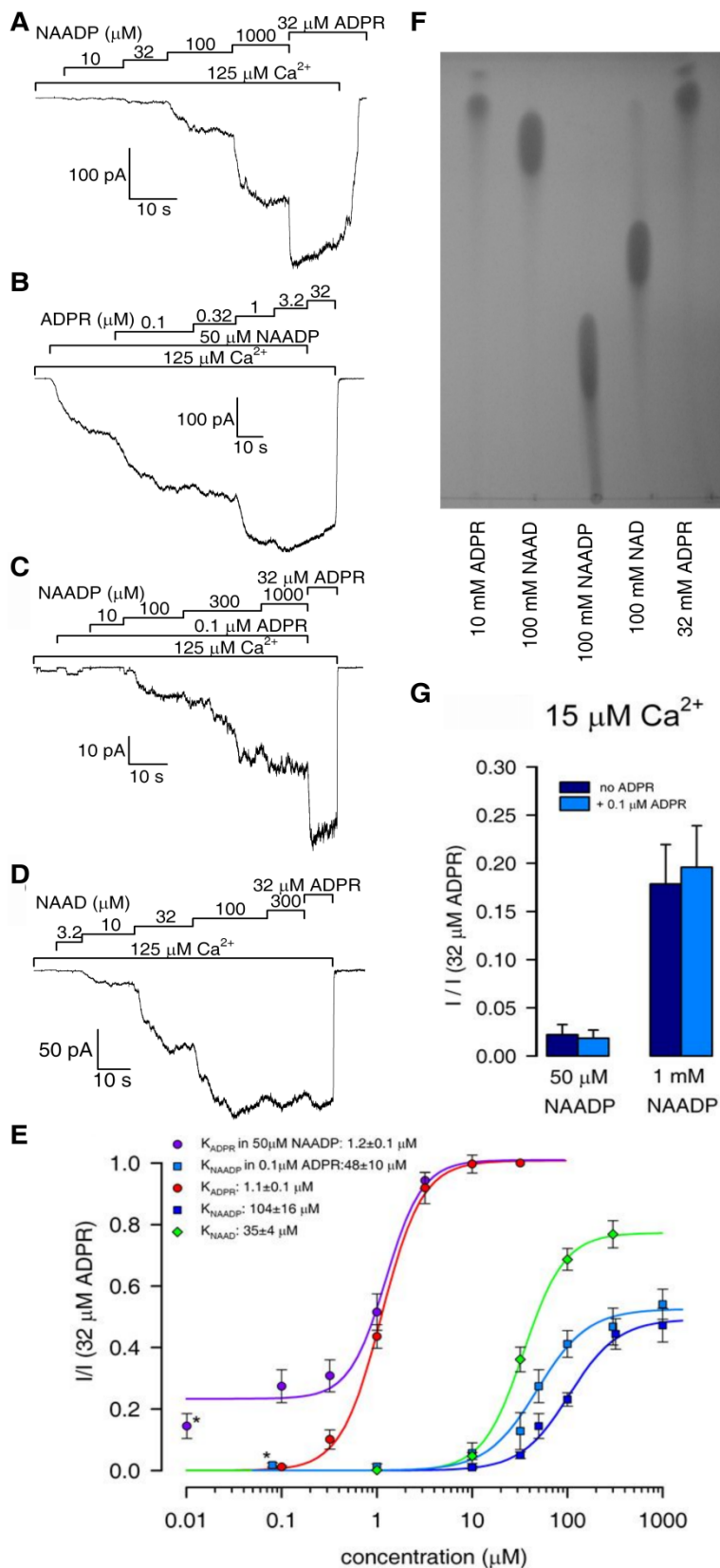
C, F, I, 10 μM tisztított cADPR* kiváltotta relatív áram (bal szélső oszlopok); illetve 0,1 vagy 1 μM ADPR kiváltotta relatív áramok 10 μM tisztított cADPR* jelenlétében (világoskék oszlopok), illetve hiányában (sötétkék oszlopok). Az áramok a 32 μM ADPR mellett mért áramhoz lettek normalizálva. (**C**) telítési (125 μM) Ca^{2+} ; (**F**) féltelítési (15 μM) Ca^{2+} ; (**I**) féltelítési (15 μM) Ca^{2+} és 2 μM kalmodulin

* A 10 μM tisztított cADPR mellett az ADPR lebontásából származó ~2-3 μM AMP és ribóz-5P is jelen van.

NAADP hatékony Ca^{2+} mobilizáló molekula, e mérések alapján nem dönthető el, vajon a TRPM2 fehérjéhez közvetlenül kötődve, vagy az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növelése által közvetett módon hatott-e. Ezért izolált membrános mérésekben is megvizsgáltuk az NAADP hatását.

Első kísérleteinkben $100 \mu\text{M}$ NAADP-t használtunk telítési ($125 \mu\text{M}$) Ca^{2+} mellett. Az egészszejtes méréseknek megfelelően az NAADP aktiválta a TRPM2 csatornákat, azonban a viszonylag magas koncentráció ellenére csak a maximális áram $23,1 \pm 2,2$ %-át váltotta ki, ezért felvetődött, hogy az aktiváló hatást ebben az esetben is ADPR kontamináció okozhatná. Ezért TLC segítségével ellenőriztük NAADP törzsoldatunk tisztaságát, de abban nem találtunk ADPR szennyezést (22. F ábra). Ezután meghatároztuk különböző koncentrációjú NAADP oldatok aktiváló hatását (22. A ábra): a mért áram értékeket az ugyanazon patch-ben telítési ADPR által kiváltott áram értékéhez normalizáltuk, majd ábráztuk az NAADP koncentráció függvényében (22. E ábra, sötétkék négyzetek). A kapott dózis-hatás görbét a Hill-egyenlettel illesztve (sötétkék görbe) az NAADP félhatásos koncentrációja ($K_{1/2}$) $104 \pm 16 \mu\text{M}$ -nak adódott, így telítési koncentrációja a mM-os tartományba esett. Az NAADP dózis-hatás görbéjét az ADPR-ével (22. E ábra, piros görbe) összehasonlítva két szembevető különbség látható: egyrészt az NAADP látszólagos affinitása két nagyságrenddel kisebb az ADPR-énál, másrészt az NAADP telítési koncentrációban sem képes a csatornákat teljes mértékben aktiválni ($I_{\text{max}}/I_{32 \mu\text{M ADPR}} = 49 \pm 4\%$), azaz csak parciális agonista.

Az egészszejtes mérésekben az ADPR és az NAADP már kis koncentrációban alkalmazva is drámaian fokozták egymás hatását (102,104). E jelenség vizsgálatára két kísérletsorozatot terveztünk. Az egyikben rögzített, $0,1 \mu\text{M}$, $[\text{ADPR}]$ jelenlétében vizsgáltuk az NAADP-hatás dózisfüggését (22. C ábra), míg a másikban állandó, $50 \mu\text{M}$, $[\text{NAADP}]$ mellett az ADPR koncentrációját változtattuk (22. B ábra). A mérések alapján elkészítettük a dózis-hatás görbéket, és meghatároztuk a fél-telítési koncentrációkat (22. E ábra). Az illesztések alapján $50 \mu\text{M}$ NAADP jelenlétében az ADPR hatás (lila körök) $K_{1/2}$ -e $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$, míg $0,1 \mu\text{M}$ ADPR jelenlétében az NAADP hatás (világoskék négyzetek) $K_{1/2}$ -e $48 \pm 10 \mu\text{M}$. Tehát az együttes alkalmazás sem az NAADP, sem az ADPR dózis-hatás görbéjét nem tolta lényegesen balra, maximális hatásukat pedig nem befolyásolta.



22. ábra: Az NAADP és az NAAD hatása a TRPM2 csatornára.

(a részletes leírás a következő oldalon található)

22. ábra: Az NAADP és az NAAD hatása a TRPM2 csatornára.

A-D, Tipikus áramgörbék telítési koncentrációjú Ca^{2+} jelenlétében növekvő koncentrációjú NAADP-vel (**A** és **C**), ADPR-zal (**B**), vagy NAAD-vel (**D**) perfundált izolált membrános mérésekből. A **B** és **C** paneleken látható mérésekben $50 \mu\text{M}$ NAADP-t, illetve $0,1 \mu\text{M}$ ADPR-t is alkalmaztunk a tesztelt nukleotid mellett.

E, A nukleotidok aktiváló hatását jellemző dózis-hatás összefüggések, NAADP (kék négyzetek), NAAD (zöld négyzetek), ADPR (piros körök), ADPR $50 \mu\text{M}$ NAADP jelenlétében (lila körök), és NAADP $0,1 \mu\text{M}$ ADPR jelenlétében (világoskék négyzetek). Utóbbi kettőnél a bal szélső pontok (*) a nulla teszt nukleotid koncentráció mellett mért értéknek felelnek meg. A színes görbék a Hill-egyenlettel való illesztést ábrázolják.

F, Vékonyréteg kromatográfia $1-1 \mu\text{l}$ nukleotid mintákból. Balról jobbra haladva: 10mM ADPR, 100mM NAAD, 100mM NAADP, 100mM NAD^+ , 32mM ADPR. Az NAADP-vel és az NAAD-vel ellentétben a NAD^+ törzsoldat tartalmaz ADPR szennyezést.

G, $50 \mu\text{M}$ és 1mM NAADP relatív aktiváló hatása önmagában (sötétkék oszlopok), vagy $0,1 \text{mM}$ ADPR jelenlétében (világoskék oszlopok) féltelítési ($15\mu\text{M}$) Ca^{2+} mellett.

Mivel elvileg elképzelhető, hogy az NAADP esetleges hatásait a telítési Ca^{2+} jelenléte fedte el, végeztünk néhány kísérletet féltelítési Ca^{2+} koncentráció mellett is. E mérésekben az 50 μM vagy 1 mM NAADP kiváltotta áramot normalizáltuk a 32 μM ADPR által kiváltott áramhoz (22. G ábra, sötétkék oszlopok). Azonban az NAADP látszólagos affinitása ilyen körülmények között se növekedett meg: 50 μM NAADP az 1 mM NAADP jelenlétében mért áramnak csak 10%-át aktiválta. Sőt maximális hatékonysága még csökkent is az alacsonyabb Ca^{2+} koncentráció mellett, mert még 1 mM NAADP is csak ~20 %-át aktiválta a 32 μM ADPR kiváltotta maximális áramnak. Végül azt vizsgáltuk, hogy 0,1 μM ADPR jelenléte ilyen körülmények között befolyásolja-e az NAADP hatását, de abban nem tapasztaltunk érdemi változást (22. H ábra, világoskék oszlopok). Tehát az NAADP alacsony látszólagos affinitását és hatékonyságát, valamint az ADPR-zal való szinergia hiányát nem a telítési Ca^{2+} koncentráció okozta.

4.2.6. A nikotinsav-adenin-dinukleotid (NAAD)

Az NAAD is a NAD^+ metabolitja, amely szerkezetileg átmenetet jelent az NAADP és az ADPR között. Az NAADP-hez hasonlóan nikotinsav csoportot tartalmaz, viszont nem tartalmazza az NAADP-re jellemző nem-nukleozid ribózhhoz kapcsolódó foszfátot (21).

Az NAAD hatását a TRPM2 csatornára korábban nem vizsgálták, de miután szerkezetileg jobban hasonlít az ADPR-ra, mint az NAADP, mi fontosnak tartottuk kipróbálását. Először NAAD törzsoldatunk tisztaságát ellenőriztük TLC segítségével (22. F ábra), amely megmutatta, hogy ez a mintánk sem tartalmaz ADPR szennyezést. Ezután különböző koncentrációjú NAAD oldatok hatását vizsgálva kiderült, hogy az NAAD aktiválja a TRPM2 csatornákat (22. D ábra). Az elkészített dózis-hatás görbe alapján (22. E ábra, zöld négyzet) az NAAD látszólagos affinitása ($K_{1/2}=35\pm 4 \mu\text{M}$) körülbelül háromszorosa az NAADP-ének, de jóval kisebb az ADPR-énál. Az NAAD még telítési koncentrációban sem képes a TRPM2 csatornák teljes aktiválására ($I_{\text{max}}/I_{32 \mu\text{M ADPR}} = 77\pm 4\%$). Vagyis maximális aktiváló képessége is az ADPR-é és az NAADP-é közé esik.

4.2.7. A nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺)

Egészsejtes mérésekben a NAD⁺ is aktiválta a TRPM2 csatornákat (77,98,101,118), ehhez azonban nagyon magas, 1 mM-os, koncentrációban kellett alkalmazni, és hatása így is csak késéssel jelentkezett. Ez valószínűsíti, hogy a NAD⁺ nem közvetlenül hat. Ezt tisztázandó, meg szeretnénk volna vizsgálni a NAD⁺ hatását is, de a TLC alapján (22. F ábra) NAD⁺ törzsoldatunk jelentős mennyiségű ADPR szennyezést tartalmazott, és ebben az esetben nem állt rendelkezésünkre olyan enzim, amelyik képes lett volna az ADPR szelektív lebontására.

4.3. A TRPM2 csatorna irreverzibilis inaktivációjának kiküszöbölése

Bár a csatorna közvetlen modulátorait makroszkópos mérések alapján már azonosítottuk, a kapuzás molekuláris mechanizmusáról egyelőre keveset tudunk. Ennek tisztázásában nagy segítséget nyújthatna egyedi csatornák steady-state kapuzásának analízise. Azonban a sejtből kiszakítva a TRPM2 csatornák körülbelül félpérfeszítés időállandóval ($\tau=29\pm 5$ s, $n=19$) irreverzibilisen inaktiválódnak (1.2.5.3. fejezet, 6. ábra), ezért nem lehet állandó csatornaszám mellett elegendően hosszú méréseket végezni ilyen típusú az elemzésekhez. Ezért megpróbáltuk feltárni, milyen molekuláris mechanizmus állhat az inaktiváció hátterében, illetve megpróbáltunk módot találni a folyamat lassítására/megszüntetésére.

4.3.1. Az inaktiváció molekuláris mechanizmusának vizsgálata

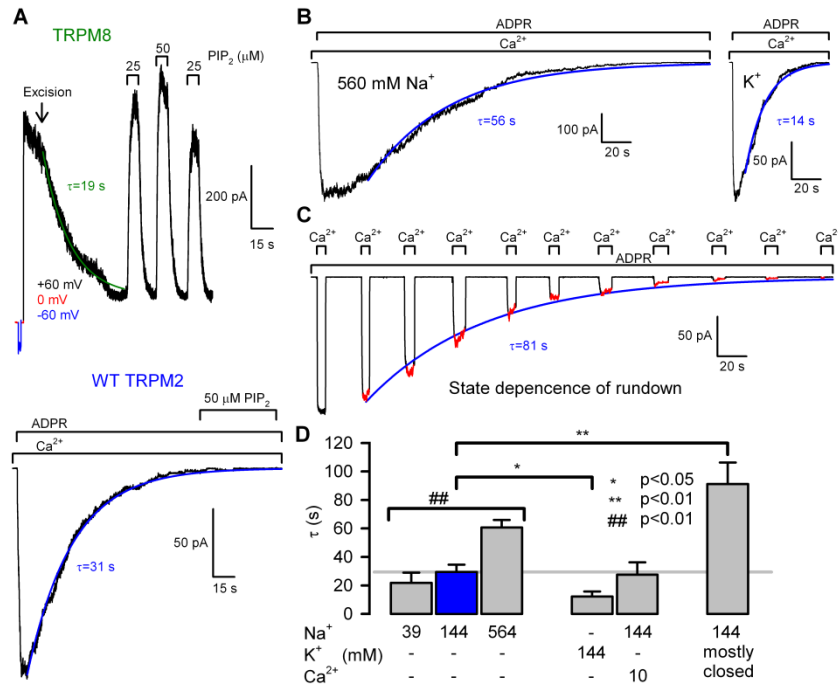
Izolált membrános mérésekben a csatornák inaktivációja mögött számos mechanizmus állhat. A CFTR csatorna esetében ezt a fehérje defoszforilációja okozza, és a csatorna aktivitása visszaállítható protein kináz A (PKA) katalitikus alegysége segítségével, amely ATP jelenlétében visszafoszforilálja a megfelelő szerin oldalláncokat (158). Egy másik gyakori ok a csatorna működése szempontjából fontos alegység, például kalmodulin, kimosása (159). A Ca²⁺ aktivált BK csatornák esetében pedig kritikus cisztein oldalláncok oxidációja áll az inaktiváció hátterében (160). A TRPM2 csatorna vonatkozásában a kutatócsoportunk a PKA és a kalmodulin szerepét

már korábban kizárta (52), és H₂O₂-dal végzett méréseink alapján az sem valószínű, hogy oxidáció okozná az inaktivációt.

A foszfatidil-inozitol-(4,5)-biszfoszfát (PIP₂), a plazmamembrán citoplazmatikus rétegében található leggyakoribb foszfatidil-inozitol (PI) származék (161). A patch kiszakítása után a membránban található PIP₂ a jelenlévő lipid-foszfataz enzimek hatására gyorsan lebomlik (162). A TRPM család számos tagjának (például TRPM4, 5, 7 és 8) szabályozásában szerepet játszik a PIP₂ (61,108,163-165). A TRPM7 és 8 esetében a PIP₂ depléciója a csatornák inaktivációjához vezet, így izolált membrános mérésekben e csatornák árama gyorsan csökken (61,164). Ugyanakkor a szabad PIP₂ mennyiség változtatásával e csatornák inaktivációja befolyásolható. A lipid-foszfatazok aktivitását a Mg²⁺ fokozza, ezért Mg²⁺-mentes oldatok használatával a PIP₂ bontás, és így az inaktiváció lassítható. Mg²⁺-ATP jelenlétében a PI-kinázok újraszintetizálják a PIP₂-t, így a már inaktiválódott csatornák is reaktiválódnak. Végül, a csatornák működése exogén PIP₂ (dioktanoil- vagy dipalmitoil-PIP₂) alkalmazásával is helyreállítható. A TRPM8 esetében igazolták, hogy a PIP₂ hatása a TRP domén pozitív töltésű aminosav oldalláncaihoz köthető (61). A többi TRPM csatornához hasonlóan a TRPM2 is tartalmazza ezt a domént, ezért kipróbáltuk, hogy a PIP₂ ennek a csatornának az inaktivációját is befolyásolja-e.

Méréseinkhez pozitív kontrollként a humán TRPM8 csatornát használtuk. E csatornák aktiválásához standard Na-glukonátos pipettaoldatunkat 500 μM mentollal egészítettük ki, amely a TRPM8-at kifejező petesejtekben már a szoros tapadás kialakulása során, "cell-attached" konfigurációban jelentős kifelé rektifikáló áramot eredményezett 25°C-on. A patch kiszakítását követően viszont a TRPM8 csatornák másodpercek alatt inaktiválódtak. Mg²⁺-mentes kádoldatot használva a kiszakítást követő inaktiváció sebessége jelentősen csökkent ($V_m = +60$ mV mellett mérve: $\tau = 23 \pm 4$ s, $n = 5$), emellett a teljes inaktivációt követően adott 25 μM dioktanoil-PIP₂ (diC₈-PIP₂) azonnal, és szinte teljesen helyreállította a kiszakítás előtti áramot, amit 50 μM diC₈-PIP₂ már csak alig növelt tovább (23. A ábra, felső áramgörbe). Tehát kísérleti rendszerünk alkalmas ioncsatornák PIP₂-függésének vizsgálatára.

A TRPM8 csatornával ellentétben a TRPM2 esetében a Mg²⁺-mentes kádoldat nem befolyásolta az inaktiváció sebességét ($\tau = 29 \pm 5$ s, $n = 9$), és 50 μM diC₈-PIP₂ sem az áram fogyását nem volt képes lassítani, sem a már inaktiválódott csatornákat nem



23. ábra: A TRPM2 inaktivációs kinetikájának vizsgálata.

A, A TRPM8 (fent) és a vad típusú TRPM2 (lent) csatornák inaktivációja Mg^{2+} -mentes oldatok jelenlétében izolált membrános mérésekben, és a diC_8 -PIP₂ hatása e folyamatra. A TRPM8 csatornák a pipettában lévő 500 μM mentol hatására már a patch kiszakítása előtt aktiválódtak. A -60, 0 és +60 mV feszültség mellett mért áramok a csatorna kifelé rektifikáló tulajdonságát szemléltetik. A membránfolt kiszakítása után (nyíl) az áram gyorsan csökken, de diC_8 -PIP₂-vel a csatornák reaktiválhatók. A TRPM2 csatornákat a kiszakítás után 32 μM ADPR-zal és 125 μM Ca^{2+} -mal aktiválva a csatornák lassabban inaktiválódnak, és diC_8 -PIP₂-vel nem lehet helyreállítani aktivitásukat.

B, Jellegzetes mérések vad típusú TRPM2 inaktivációs sebességének vizsgálatához -20 mV-on, telítési ADPR és Ca^{2+} mellett, szimmetrikus 564 mM Na^+ -ban (bal áramgörbe), illetve 140 mM K^+ -ban (jobb áramgörbe).

A és B, az inaktivációs sebesség jellemzéséhez a görbékre exponenciális illesztettünk (színes vonalak).

C, Az inaktiváció állapotfüggőségének vizsgálatára használt protokoll: a patch kiszakítása után a csatornákat -20 mV-on, telítési ADPR folyamatos jelenlétében de Ca^{2+} hiányában, az idő nagy részében zárva tartottuk, és telítési Ca^{2+} alkalmazásával csak rövid időtartamokra nyitottuk ki. Az inaktiváció sebességét a pirossal jelölt szakaszokra illesztett exponenciális (kék vonal) időállandójával jellemeztük.

D, A vad típusú TRPM2 csatorna inaktivációs sebességének jellemzésére kapott időállandók különböző ionkörnyezetekben, illetve a C ábrán bemutatott protokollt használva. A kontroll körülmények között mért értéket a kék oszlop mutatja.

stimulálta (23. A ábra, alsó áramgörbe). Vagyis a TRPM2 csatorna inaktivációját nem a membrán PIP₂ tartalmának fogyása okozza.

Egy másik sokat tanulmányozott mechanizmus a feszültségfüggő K⁺ csatornákra jellemző C-típusú inaktiváció, amelyet a csatorna pórusának konformáció-változása, összeesése okoz. Ennek jellegzetessége, hogy sebessége erősen függ az ionkörnyezettől, illetve a csatorna állapotától – az inaktiváció elsősorban nyitott aktivációs kapu mellett következik be. Ezért megvizsgáltuk, hogy a TRPM2 csatorna inaktivációját hogyan befolyásolja különböző fajtájú és koncentrációjú ionok alkalmazása, illetve hogy van-e különbség a nyitott és a csukott csatornák inaktivációjának sebessége között.

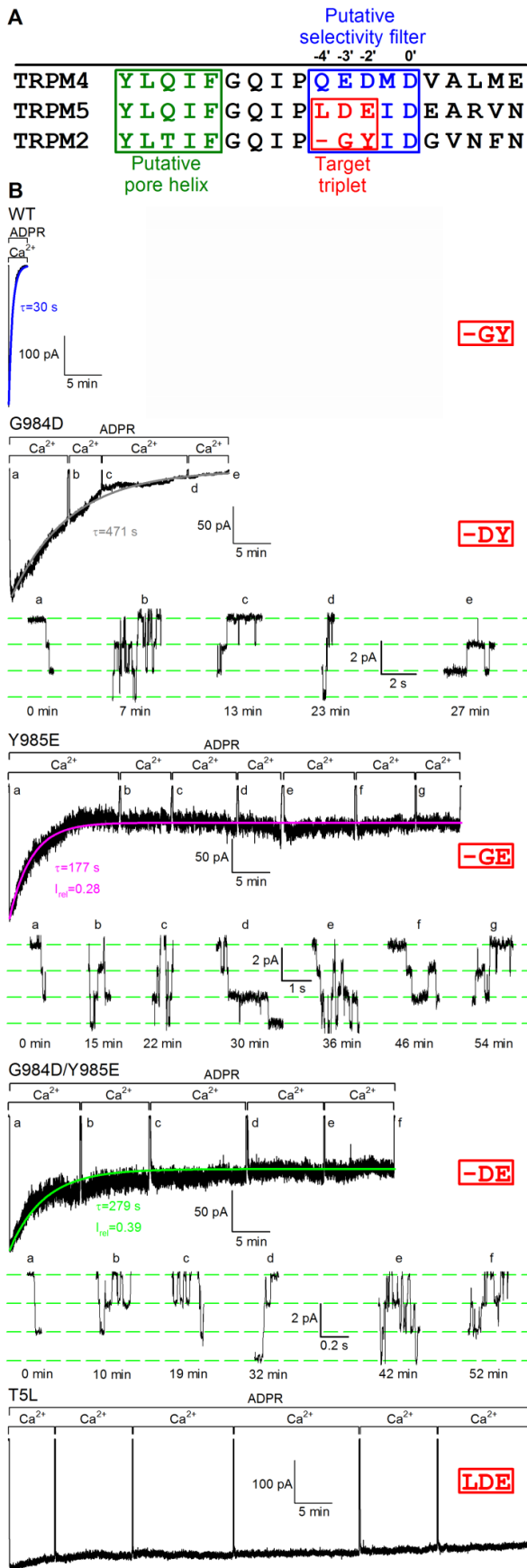
Permeáló ionként először szimmetrikusan alkalmazott, különböző koncentrációjú Na⁺-ot tartalmazó oldatokat használtunk, és szignifikáns összefüggést találtunk a Na⁺ koncentráció és az inaktivációs sebesség között ($p < 0,01$, ANOVA): 39 mM Na⁺ esetén az inaktiváció kismértékben gyorsult ($\tau = 22 \pm 7$ s, $n = 8$), míg 564 mM Na⁺ alkalmazásakor ($\tau = 61 \pm 5$ s, $n = 9$) körülbelül kétszer lassabb lett (23. B és D ábra) a standard, 144 mM Na⁺-ot tartalmazó, környezetben mérthez viszonyítva. Ezután a Na⁺-ot mindkét oldalon K⁺-ra cseréltük, ami nagyjából kétszer gyorsabbá ($\tau = 12 \pm 3$ s, $n = 15$) tette az inaktivációt (23. B és D ábra). Végül, hogy a divalens kationok hatását is megvizsgáljuk, az extracelluláris oldathoz a 144 mM Na⁺ mellé 10 mM Ca²⁺-ot is hozzáadtunk, de ez nem befolyásolta ($\tau = 28 \pm 9$ s, $n = 7$) az inaktiváció sebességét (23. D ábra).

Az inaktiváció állapotfüggésének vizsgálatához a 23. C ábrán látható protokollt használtuk. Ennek során a vad típusú TRPM2 csatornákat 32 μ M ADPR-t tartalmazó, de Ca²⁺-mentes oldat alkalmazásával a mérés időtartamának túlnyomó részében zárva tartottuk. A maximálisan aktiválható csatornák számának nyomon követése céljából, rövid időszakokra aktiváltuk őket telítési Ca²⁺ hozzáadásával. Ilyen körülmények között a csatornák jelentősen hosszabb idő alatt inaktiválódtak ($\tau = 91 \pm 15$ s, $n = 7$), ami arra utal, hogy e folyamat valóban lassabb zárt állapotban. Figyelembe véve, hogy e protokoll során a csatornák az idő körülbelül 25 %-át töltötték nyitott állapotban, megbecsülhető a csukott állapotra jellemző inaktivációs időállandó ($\tau \sim 270$ s), amelynek fényében megállapítható, hogy a csukott csatornák a nyitottakhoz képest tízszer lassabban inaktiválódnak.

Vagyis a TRPM2 inaktivációja több szempontból is hasonlít a feszültségfüggő K^+ csatornák C-típusú inaktivációjához, ezért feltételezhető volt, hogy a háttérben itt is a szelektáló filter konformáció változása áll.

4.3.2. Pórusmutánsok készítése (a T5L mutáns)

Eredményeink alapján a szelektáló filter jó célpontnak tűnt az inaktiváció befolyásolására, különösen annak fényében, hogy a rokon TRPM4 csatorna egyes pórusmutásai rendkívül gyors inaktivációt mutatnak (166). Ezért összehasonlítottuk a TRPM4 és legközelebbi rokona, a TRPM5, pórus régióját a TRPM2 csatornáéval (24. A ábra). A három homológ szakasz jelentős szekvencia azonosságot mutat. A legtöbb kálium, illetve az összes TRPM csatornához hasonlóan, e három szekvenciában is megtalálható a szelektáló filter C-terminális végén a 0'-vel számozott invariáns aszpartát. A legjelentősebb különbségek éppen e referenciapontot megelőző pozíciókban találhatók. A TRPM4 és 5 esetében negatív töltésű aminosavakat találunk a -2' és -3' helyeken, míg a TRPM2-ben itt a kálium csatornákra jellemző glicin és tirozin van. Emellett a TRPM2 a -4' pozícióban deléciókat tartalmaz. Érdekes módon a TRPM4 pórusmutásai közül éppen azok inaktiválódtak gyorsan, amelyekben -2'/-3' pozíció valamelyikének negatív töltését semlegesre cserélték, illetve amelyekben a -4' pozíciójú aminosavat törölték (166). A Shaker kálium csatornáknál már szintén igazolták, hogy a szelektáló filter környékén található negatív töltések, illetve ezeknek egymáshoz viszonyított relatív helyzete jelentős hatással van a C-típusú inaktiváció sebességére (167). Ennek alapján arra gondoltunk, hogy negatív töltések bevitelével, esetleg a deléció megszüntetése stabilizálhatná a TRPM2 pórust, megakadályozva az inaktivációt. Mivel a TRPM5 szekvencia ebben a régióban jobban hasonlít a TRPM2-éhez, ezért ezt választottuk mintának. A -3' és -2' helyeken található aminosavakat külön-külön, illetve együttesen lecseréltük a TRPM5-ben itt található negatív töltésű aszpartátra, illetve glutamátra (G984D, Y985E, G984D/Y985E). Végül, a duplamutánst kiegészítettük a hiányzó leucinnal is: az így kapott T5L ("TRPM5-like") csatorna pórusszekvenciája teljes mértékben megegyezik a TRPM5-ével.



24. ábra: A TRPM2 pórusmutások inaktivációjának vizsgálata.

A, A TRPM2/4/5 pórus régióját alkotó aminosav szekvenciák összehasonlítása. Zöld színnel jelölve a feltételezett pórus hélix, késsel a szelektáló filter. A mutációkkal célzott három aminosavat pirossal emeltük ki.

B, A vad típusú TRPM2 és a négy pórusmutáns 125 μ M Ca²⁺ és 32 μ M ADPR jelenlétében -20 mV-on mért makroszkópos áramai. A mutánsokkal végzett hosszú mérések során periodikusan, rövid időtartamokra, elvontuk a Ca²⁺-ot, hogy a csatornák átmeneti bezárásával nyomonkövethessük a membrán tapadásának épségét. Az inaktivációs sebesség jellemzéséhez a görbékre exponenciálisakat illesztettünk (színes vonalak). A pirossal keretezett betűk a célzott pozíció-triplet szekvenciáját mutatják. A G984D, az Y985E és a G984D/Y985E mutánsok görbéi alatt kinagyítottuk a kezdeti aktiváció, illetve a periodikus Ca²⁺ elvonás kiváltotta deaktiváció/reaktiváció, során tisztán feloldhatóvá váló egyedi csatorna áramokat, amelyek amplitúdója egyik esetben sem változott a mérés teljes időtartama során.

4.3.3. Mutánsok inaktivációjának összehasonlítása

A vad típushoz hasonlóan a mutáns csatornák is jól kifejeződtek *Xenopus* petesejtekben, és agonisták jelenlétében izolált membrános inside-out patch-ekben is makroszkópos áramokat eredményeztek. Míg a vad típusú csatorna árama telítési ADPR és Ca^{2+} mellett (24. B ábra, WT görbe) a kiszakítás után gyorsan csökkent ($\tau = 29 \pm 5$ s, $n = 19$), a mutánsoknál az inaktiváció mértéke és sebessége jelentősen megváltozott. A G984D mutáns – amely a -3' pozícióban negatív töltésű aszpartátot tartalmaz – teljes mértékben inaktiválódott (24. B ábra, G984 görbe), de több mint tízszer lassabban ($\tau = 514 \pm 22$ s, $n = 3$), mint a vad típusú csatorna. Az Y985E mutánsnál – amelyben a -2' helyen található tirozint cseréltük le negatív töltésű glutamára – szintén jelentősen lassult az inaktiváció ($\tau = 156 \pm 17$ s, $n = 3$), ráadásul az áram körülbelül harmada ($I_{\text{rel}} = 0,28 \pm 0,05$ s, $n = 3$) tartósan megmaradt (24. B ábra, Y985E görbe). A két negatív töltést tartalmazó duplamutáns – G984D/Y985E – nagyon hasonlóan viselkedett az Y985E-hez (24. B ábra, G984/Y985E görbe): egyrészt a vad típusnál lassabban inaktiválódott ($\tau = 208 \pm 72$ s, $n = 4$), másrészt az áram közel fele a mérés teljes időtartama alatt fennmaradt ($I_{\text{rel}} = 0,43 \pm 0,08$ s, $n = 4$). Ez arra utal, hogy a -2' és a -3' pozíciókba bevitt negatív töltések hatása nem teljesen additív. Fontos megjegyezni, hogy az áram csökkenése a vad típushoz hasonlóan, a pórusmutánsok esetén is a maximálisan aktiválható csatornák számának fogyását tükrözi, mert az egyedi csatornák vezetőképessége a mérés során állandó maradt (lásd 24. B ábra áramgörbéi alatt látható kinagyított egyedi csatorna események), és variancia analízis a csatornák nyitvatartási valószínűségében sem mutatott jelentős csökkenést. A legdrámaibb hatást az inaktivációra az okozta, amikor a két negatív töltés mellé a hiányzó leucint is inzertáltuk a -4' pozícióba, ezzel rekonstruálva a TRPM5 pórus szekvenciáját (T5L mutáns). Telítési ADPR és Ca^{2+} jelenlétében a T5L csatorna árama még egy óra elteltével is alig változott (24. B ábra, T5L görbe). Bár a mérés elején tapasztalható volt egy minimális csökkenés, ennek mértéke a teljes áramhoz képest olyan kicsi volt, hogy érdemben nem lehetett exponenciálissal illeszteni.

4.3.4. Alkalmas-e a T5L mutáns a TRPM2 kapuzásának modellezésére?

A maximálisan aktiválható T5L csatornák száma még hosszú mérések során is alig változik, ezért ez a mutáns alkalmas lehet egyedi-csatornás mérésekre. Azonban

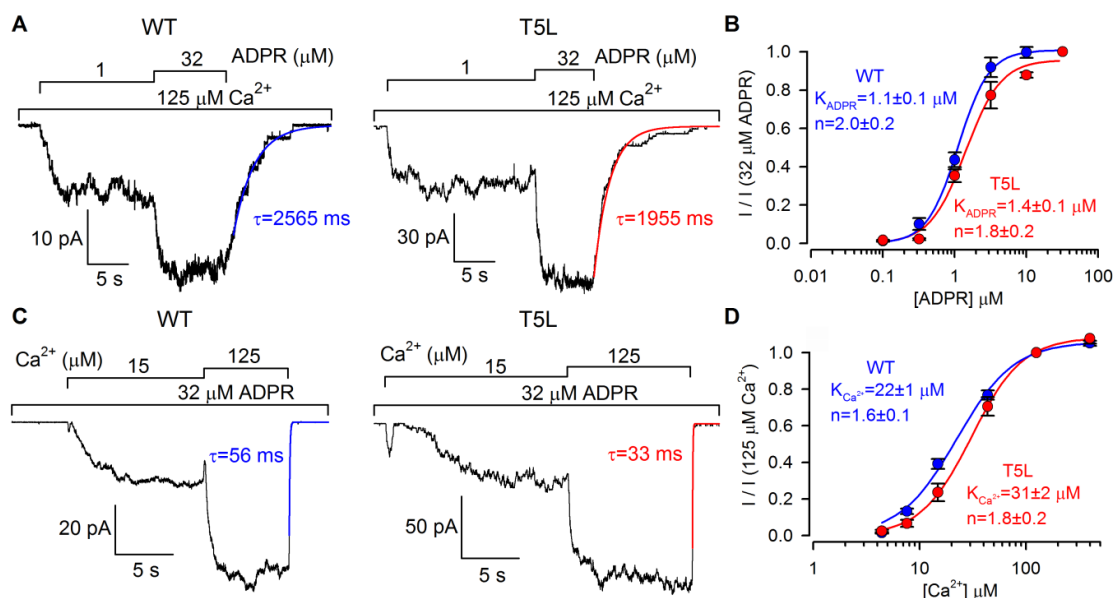
ahhoz, hogy a TRPM2 ADPR-, illetve Ca^{2+} -függő kapuzásának részletes biofizikai vizsgálatához használhassuk, előbb meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy a T5L pórusmutáció nem változtatta meg a csatorna működését. Ennek igazolására makroszkópos mérésekben összehasonlítottuk a vad típus és a T5L variáns aktivációjának ADPR és Ca^{2+} koncentráció-függését, illetve egyedi- csatornás mérések segítségével megvizsgáltuk, hogy a mutáns alapvető kapuzási paraméterei eltérnek-e a vad típusú csatornára jellemző értékektől (52).

4.3.4.1. Vad típusú és T5L mutáns csatorna ADPR és Ca^{2+} iránti affinitásának összehasonlítása makroszkópos mérésekben

Először az ADPR aktiváló hatását vizsgáltuk telítési Ca^{2+} jelenlétében. Az ADPR mindkét típusú csatornát koncentráció-függő módon aktiválta (25. A ábra). Az egyes koncentrációk mellett mért áramokat a $32 \mu\text{M}$ ADPR-ban mérthez normalizálva elkészítettük a csatornák ADPR dózis-hatás összefüggését (25. B ábra), amelyeket a Hill-egyenlettel illesztettünk. A kapott paraméterek (vad típus: $K_{1/2} = 1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $n_H = 2,0 \pm 0,2$; T5L: $K_{1/2} = 1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $n_H = 1,8 \pm 0,2$) alapján a mutáció nem befolyásolta lényegesen az ADPR iránti látszólagos affinitást.

Ezután a kétféle csatorna típus aktivációjának Ca^{2+} koncentráció-függését hasonlítottuk össze telítési ADPR jelenlétében (25. C ábra). A mért áramokat a $125 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -ban mérthez normalizáltuk, és az így kapott dózis-hatás görbéket szintén a Hill-egyenlettel illesztettük (25. D ábra). A kapott paraméterek (vad típus: $K_{1/2} = 22 \pm 1 \mu\text{M}$, $n_H = 1,6 \pm 0,1$; T5L: $K_{1/2} = 31 \pm 2 \mu\text{M}$, $n_H = 1,8 \pm 0,2$) ebben az esetben is nagyon hasonlóknak adódtak.

A vad típusú TRPM2 csatorna egyik jellegzetessége, hogy teljesen eltérő kinetikával reagál a két aktiváló ligand hirtelen elvonására. ADPR jelenlétében az intracelluláris Ca^{2+} pillanatszerű elvonásakor a csatornák rendkívül gyorsan bezárnak ($\tau \sim 50 \text{ ms}$; 25. C ábra). Ez arra utal, hogy a Ca^{2+} kötőhelyek nyitott állapotban is szabadon hozzáférhetők, így az intracelluláris Ca^{2+} elvonásakor a kötött Ca^{2+} gyorsan disszociálhat, és a csatorna bezáródhat. Ezzel szemben, ha Ca^{2+} jelenlétében az ADPR-t vonjuk el, akkor a vad típusú csatornák két nagyságrenddel lassabban csukódnak be ($\tau = 2751 \pm 203 \text{ ms}$, $n = 10$; 25. A ábra). Ez alapján megállapítható, hogy a csatorna nyitott



25. ábra: A T5L mutáns és a vad típusú TRPM2 kapuzásának összehasonlítása makroszkópos mérésekben.

A, Emelkedő koncentrációjú ADPR és telítési Ca^{2+} jelenlétében, -20 mV-on mért makroszkópos vad típusú (bal) és T5L (jobb) csatorna áramok. Az ADPR elvonását követő záródási sebesség jellemzéséhez az áramgörbékre exponenciálist illesztettünk (kék és piros vonal).

B, Az ADPR vad típusú (kék) és T5L (piros) TRPM2-re gyakorolt aktiváló hatását jellemző normalizált dózis-hatás összefüggések 125 μM Ca^{2+} jelenlétében. A vonalak a Hill-egyenlettel való illesztést ábrázolják.

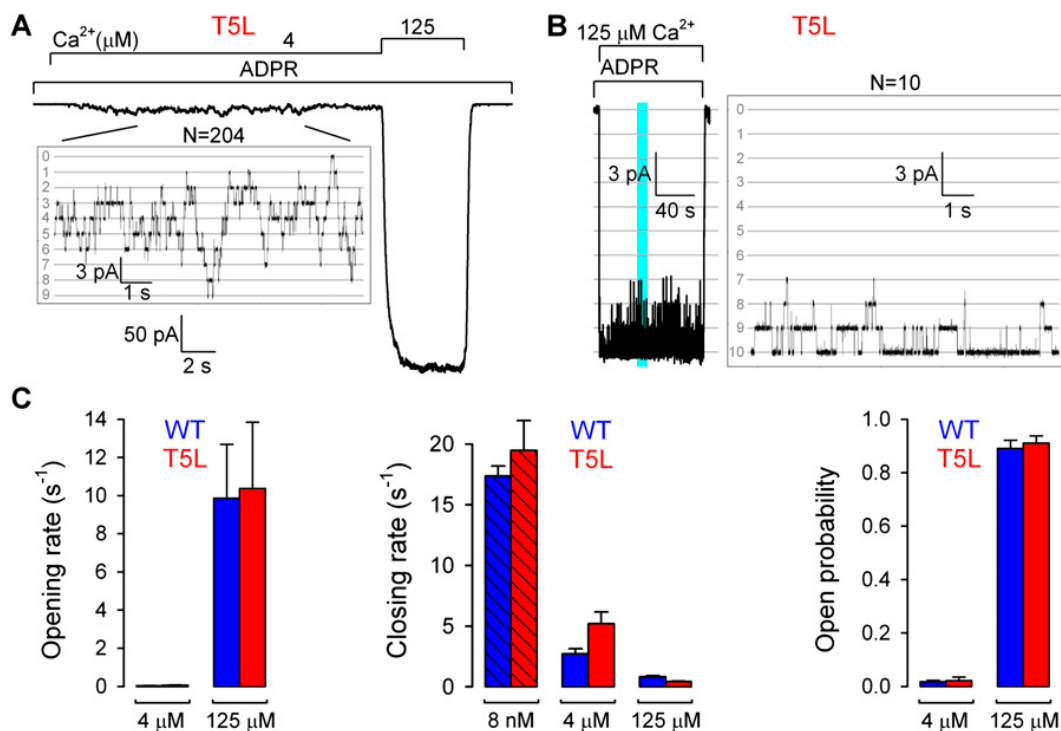
C, Emelkedő koncentrációjú Ca^{2+} és telítési ADPR jelenlétében, -20 mV-on mért makroszkópos vad típusú (bal) és T5L (jobb) csatorna áramok. A Ca^{2+} elvonását követő záródási sebesség jellemzéséhez az áramgörbékre exponenciálist illesztettünk (kék és piros vonal).

D, A Ca^{2+} vad típusú (kék) és T5L (piros) TRPM2-re gyakorolt aktiváló hatását jellemző normalizált dózis-hatás összefüggések 32 μM ADPR jelenlétében. A vonalak a Hill-egyenlettel való illesztést ábrázolják.

állapotában a NUDT9-H doménhez kötődő ADPR nem tud gyorsan egyensúlyba kerülni az intracelluláris oldalt perfundáló oldattal. Ennek többféle magyarázata is lehet: elképzelhető, hogy az ADPR nagyon erősen kötődik a csatornához, vagy a nyitás során bekövetkező konformáció-változás következtében az ADPR kötőhelye bezáródik, és nem hozzáférhető az oldat számára. Bár a valós okot nem ismerjük, azt mindenesetre megállapíthattuk, hogy ez a markáns kinetikai különbség megmaradt a T5L mutáns esetében is: a vad típusúhoz hasonlóan, a mutáns csatornák is Ca^{2+} elvonásakor gyorsan, míg ADPR elvonásakor lassan záródnak be (25. A és C ábrák).

4.3.4.2. Vad típusú és T5L mutáns csatorna kapuzási paramétereinek összehasonlítása egyedi-csatornás mérésekben

A makroszkópos mérésekben kapott eredmények nagyon biztatók voltak, ezért megvizsgáltuk azt is, hogy vajon a T5L pórusmutáció befolyásolja-e a steady-state egyedi-csatornás mérésekből meghatározható kapuzási paramétereiket. A T5L mutánssal ezek a mérések egyszerűen kivitelezhetők, azonban a vad típusú csatorna esetében körülményesek. Mivel kutatócsoportunk már korábban publikálta a vad típusú csatorna átlagos kapuzási paramétereinek Ca^{2+} koncentráció-függését (52), ezért az ott leírt értékeket használtuk kontrollnak (26. C ábra, kék oszlopok), és jelen munkában csak a T5L mutánst vizsgáltuk. Három paramétert határoztuk meg alacsony ($4 \mu\text{M}$), illetve telítési ($125 \mu\text{M}$) $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett (mindkét esetben $32 \mu\text{M}$ ADPR jelenlétében): a nyitvatartási valószínűséget (P_o), az átlagos nyitási sebességet (k_{co}) és az átlagos záródási sebességet (k_{oc}). Telítési Ca^{2+} koncentrációnál a steady-state egyedi csatorna elemzésekhez a 26. B ábrán láthatóhoz hasonló, maximum 10 aktív csatornát tartalmazó, patch-eket használtunk fel. Ilyen körülmények között a csatornák P_o -ja nagyon magas – közel 1 –, így számuk pontosan megállapítható. Ezzel szemben $4 \mu\text{M}$ Ca^{2+} mellett a csatornák csak nagyon ritkán nyitnak, ezért ahhoz, hogy ilyen körülmények között is kapjunk elegendő eseményt az elemzéshez, néhány száz csatornát tartalmazó patch-eket kellett használnunk, amelyekben a tényleges csatornaszámot a vizsgált szakasz után alkalmazott telítési Ca^{2+} jelenlétében határoztuk meg (26. A ábra). A 3.4.4.4. fejezetben leírt algoritmussal becsült paraméterek a 26. C ábrán láthatók (piros oszlopok). A középső diagramon szerepel még egy harmadik,



26. ábra: A T5L mutáns és a vad típusú TRPM2 kapuzásának összehasonlítása egyedi csatorna mérések elemzésével.

A, 4 μM citoszólikus Ca²⁺ (és 32 μM ADPR) mellett az egyedi csatorna események tisztán feloldhatóak maradnak (szürke keretben kiemelt szakasz), még akkor is, ha a patch nagyszámú T5L csatornát tartalmaz. A csatornák számát (N) az egyedi csatorna áram amplitúdójának ismeretében, a vizsgált szakaszt követően alkalmazott 125 μM Ca²⁺ (és 32 μM ADPR) jelenlétében mért áram alapján becsültük meg. A membránpotenciál -20 mV volt.

B, A T5L csatorna steady-state kapuzását – 125 μM Ca²⁺ (és 32 μM ADPR) mellett – néhány csatornát tartalmazó patchekben (itt: N=10) vizsgáltuk (baloldali áramgörbe). Az egyedi csatorna események könnyebb megtekintése céljából a világoskék színnel kiemelt szakasz a jobboldali szürke keretben hosszabb időskálán is látható. A membránpotenciál -20 mV volt.

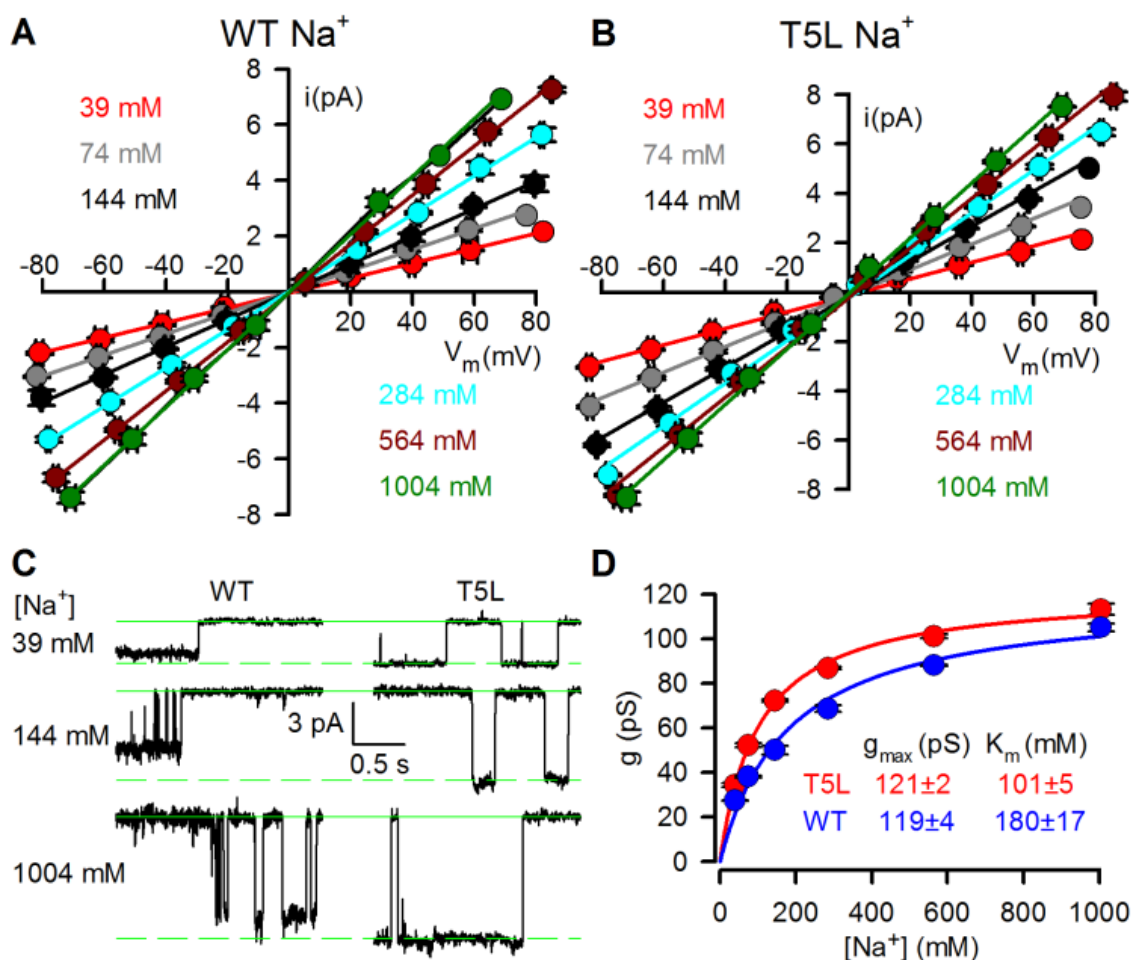
C, 4 és 125 μM Ca²⁺ (és 32 μM ADPR) jelenlétében -20 mV-on végzett steady-state egyedi csatorna mérések (lásd A és B ábra) elemzésével nyert kapuzási paraméterek: nyitási sebesség (bal), zárási sebesség (közép) és nyitvatartási valószínűség (jobb). A 8 nM Ca²⁺-hoz tartozó záródási sebesség értékek (csíkozott oszlopok) a makroszkópos mérésekben intracelluláris Ca²⁺ elvonását követően megfigyelhető záródási sebességet jelentik (lásd: 25. C ábra, illetve 33. B ábra háromszögek). Steady-state egyedi csatornás méréseket csak a T5L-csatornával végeztünk, a vad típusú csatornához tartozó kapuzási paraméterek egy már korábban publikált cikkből származnak (Csanady, L. and Torocsik, B. 2009, *J. Gen. Physiol* 133, 189-203).

sávozott oszlop is, amely 8 nM Ca^{2+} jelenlétében mutatja a csatornák becsült záródási sebességét. Mivel ilyen körülmények között a TRPM2 csatorna nyitási sebessége gyakorlatilag nulla, ezért ez a paraméter steady-state mérésekből nem becsülhető; ehelyett makroszkópos mérésekből határoztuk meg, mint a Ca^{2+} hirtelen elvonását követő áramrelaxáció időállandójának inverzét (lásd 25. C ábra; " Ca^{2+} "-mentes kádolatunkban a becsült szabad $[\text{Ca}^{2+}] \sim 8$ nM). A makroszkópos Ca^{2+} affinitás mérésekkel (25. C és D ábra) összehangban, a T5L mutáns mikroszkópos kinetikai paraméterei is a vad típushoz nagyon hasonlóknak adódtak. A Ca^{2+} koncentráció növekedésével emelkedő P_o mindkét esetben a záródási sebesség csökkenéséből, illetve a nyitási sebesség növekedéséből adódik; a záródási sebességnek a nyitáshoz viszonyított nagyobb (szubmikromólos) Ca^{2+} érzékenysége pedig arra utal, hogy mindkét típusú csatorna erősebben köti a Ca^{2+} -ot nyitott, mint csukott állapotban.

Tehát a T5L pórusmutáció – amellet, hogy megszüntette a vad típusú csatornára jellemző gyors inaktivációt, ezáltal ideális körülményeket teremtve a steady-state csatorna elemzésekhez – sem a makroszkópos affinitás terén, sem a mikroszkópos kapuzási paraméterek vonatkozásában nem változtatta meg a csatorna működését, így a T5L mutáns nagyszerű modell lehet a TRPM2 csatorna ADPR, illetve Ca^{2+} -függő kapuzási mechanizmusának tisztázására.

4.3.5. Vad típusú és a mutáns csatornák vezetőképességének összehasonlítása

Bár a T5L mutáció nem befolyásolta a TRPM2 kapuzását, az általunk használt, a membrán mindkét oldalán 144 mM Na^+ -ot tartalmazó, oldatokban a mutáns csatornák egyedi vezetőképessége körülbelül 50 %-kal nagyobbak mutatkoztak (27. C ábra), vagyis permeabilitásuk jelentősen megváltozhatott. A megnövekedett ion áteresztőképesség hátterének feltárása érdekében, széles tartományban (39 mM és 1 M között) összehasonlítottuk a vad típusú és a T5L csatornák vezetőképességének szimmetrikus $[\text{Na}^+]$ -függését. Az egyedi csatornák áram amplitúdóját minden koncentrációnál a 3.4.4.3. fejezetben leírt módszerrel határoztuk meg -80 és +80 mV között (27. A és B ábra) A T5L mutáció nem változtatta meg a vad típusra jellemző lineáris, ohmikus áram-feszültség összefüggést. A görbék pontjaira illesztett egyenesek meredekségei megadták az adott $[\text{Na}^+]$ -ra jellemző konduktanciát (27. D ábra). Bár alacsony $[\text{Na}^+]$



27. ábra: A T5L mutáns és a vad típusú TRPM2 Na⁺ iránti vezetőképességének összehasonlítása.

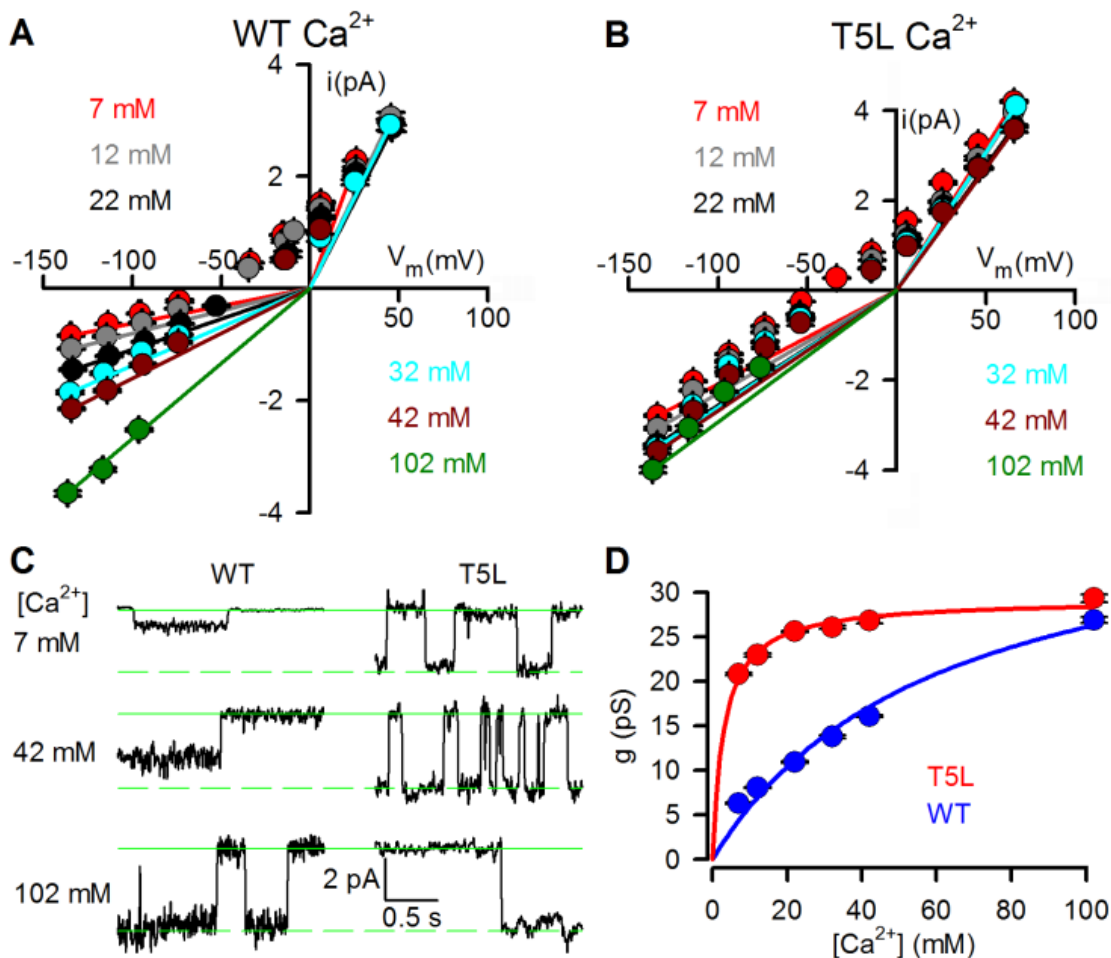
A és B, A vad típusú (**A**) és a T5L (**B**) csatorna egyedi Na⁺ áramának feszültségfüggése. A mérések során szimmetrikus elrendezést használtunk, vagyis a pipetta- és a kádoldat is azonos koncentrációjú Na⁺-ot tartalmazott. Az egyedi csatorna áramokat a 3.4.4.3. fejezetben leírtak szerint határoztuk meg.

C, A membrán két oldalán szimmetrikusan 39 (fent), 144 (középen) és 1004 (lent) mM Na-glutamátot tartalmazó oldatokban, ~ -80 mV-on mért befelé irányuló egyedi csatorna áramok a vad típusú (bal) és a T5L (jobb) csatorna esetében.

D, A vad típusú (kék) és a T5L (piros) csatorna vezetőképességének Na⁺ koncentrációfüggése. A szimmetrikus elrendezés miatt az egyes Na⁺ koncentrációkhoz tartozó vezetőképesség értékeket az áram-feszültség összefüggés pontjaira illesztett egyenes meredekségével adtuk meg (lásd: 3.4.4.3. fejezet). A görbék a Michaelis-Menten egyenlettel történt illesztést jelenítik meg.

mellett a T5L csatorna (piros körök) vezetőképessége szignifikánsan nagyobb volt a vad típusénál (kék körök), magas $[Na^+]$ -nál a vezetőképességek hasonló értékeken telítődtek. A koncentráció-függés kvantitatív jellemzéséhez a kapott pontokra a Michaelis-Menten egyenlet felhasználásával illesztettünk görbéket (27. D ábra, színes vonalak). A legjobb illesztéshez tartozó paraméterek megerősítették, hogy a T5L mutáció nem befolyásolta a csatornák maximális vezetőképességét (g_{max}), amely mindkét típusú csatormánál körülbelül 120 pS-nek adódott. Azonban a T5L mutáns esetében a féltelítési Na^+ koncentráció ($K_{1/2}$) csaknem a felére csökkent: 180±17 mM-ről 101±5 mM-ra.

A T5L pórus mintájául szolgáló TRPM5 csatorna egyértékű kationokra szelektív, így – szemben a vad típusú TRPM2-vel – nem permeábilis sem Ca^{2+} -ra, sem Mg^{2+} -ra. Mivel az extracelluláris térből bejutó Ca^{2+} -nak fontos szerepe lehet a TRPM2 fiziológiás szabályozásában (52), ezért megvizsgáltuk, hogyan befolyásolta a T5L mutáció a csatorna Ca^{2+} áteresztő képességét. Már az első kísérleteink azt mutatták, hogy a T5L mutáns Ca^{2+} permeábilis maradt, ezért összehasonlítottuk a két csatorna Ca^{2+} iránti vezetőképességének koncentráció-függését is. Ezekben a mérésekben aszimmetrikus elrendezést használtunk: az intracelluláris felszínt a standard 144 mM Na^+ -ot tartalmazó oldattal perfundáltuk, míg az extracelluláris felszínnel érintkező – Na^+ -mentes – pipettaoldat $[Ca^{2+}]$ -ját 7 és 102 mM között változtattuk (28. C ábra). Az áram-feszültség összefüggéseket (28. A és B ábra) a Na^+ esetében leírthoz hasonlóan készítettük el. Ugyanakkor az aszimmetrikus ionkörnyezet miatt a Ca^{2+} konduktanciát a 3.4.4.3. fejezetben leírt második módszerrel, vagyis az áram-feszültség grafikon legnegatívabb feszültséghez tartozó pontját az origóval összekötő egyenes meredekségeként, adtuk meg. A kapott vezetőképesség értékeket a Ca^{2+} koncentráció függvényében ábrázolva (28. D ábra), a T5L mutáns esetén (piros körök) a Na^+ -éhoz hasonló, de annál jóval nagyobb mértékű, látszólagos affinitás-növekedést tapasztaltunk. A T5L mutáns vezetőképessége már körülbelül 20 mM Ca^{2+} mellett telítődést mutat, míg a vad típus esetén ez még 100 mM körüli koncentráción sem tapasztalható. A féltelítési koncentrációk becslése céljából, a pontokra ismét a Michaelis-Menten egyenletet illesztettük. Az illesztés alapján a T5L Ca^{2+} iránti vezetőképességének látszólagos affinitása körülbelül hússzor nagyobb a vad típusénál: a $K_{1/2}$ értéke a mutánsban 61±13 mM-ről 3.1±0.4 mM-ra csökkent.



28. ábra: A T5L mutáns és a vad típusú TRPM2 csatorna Ca^{2+} iránti vezetőképességének összehasonlítása.

A és B, A vad típusú (**A**) és a T5L (**B**) csatorna egyedi csatorna áramának feszültségfüggése különböző koncentrációjú Ca^{2+} -alapú oldatok extracelluláris, és 140 mM Na^+ intracelluláris alkalmazása mellett. Az egyedi csatorna áramokat a 3.4.4.3. fejezetben leírtak szerint határoztuk meg.

C, ~ -135 mV-on mért befelé irányuló egyedi csatorna áramok a vad típusú (bal) és a T5L (jobb) csatorna esetében. A mérések során a pipettaoldat kationként a jelzett koncentrációjú Ca^{2+} -ot, míg a kádoldat 140 mM Na^+ -ot tartalmazott.

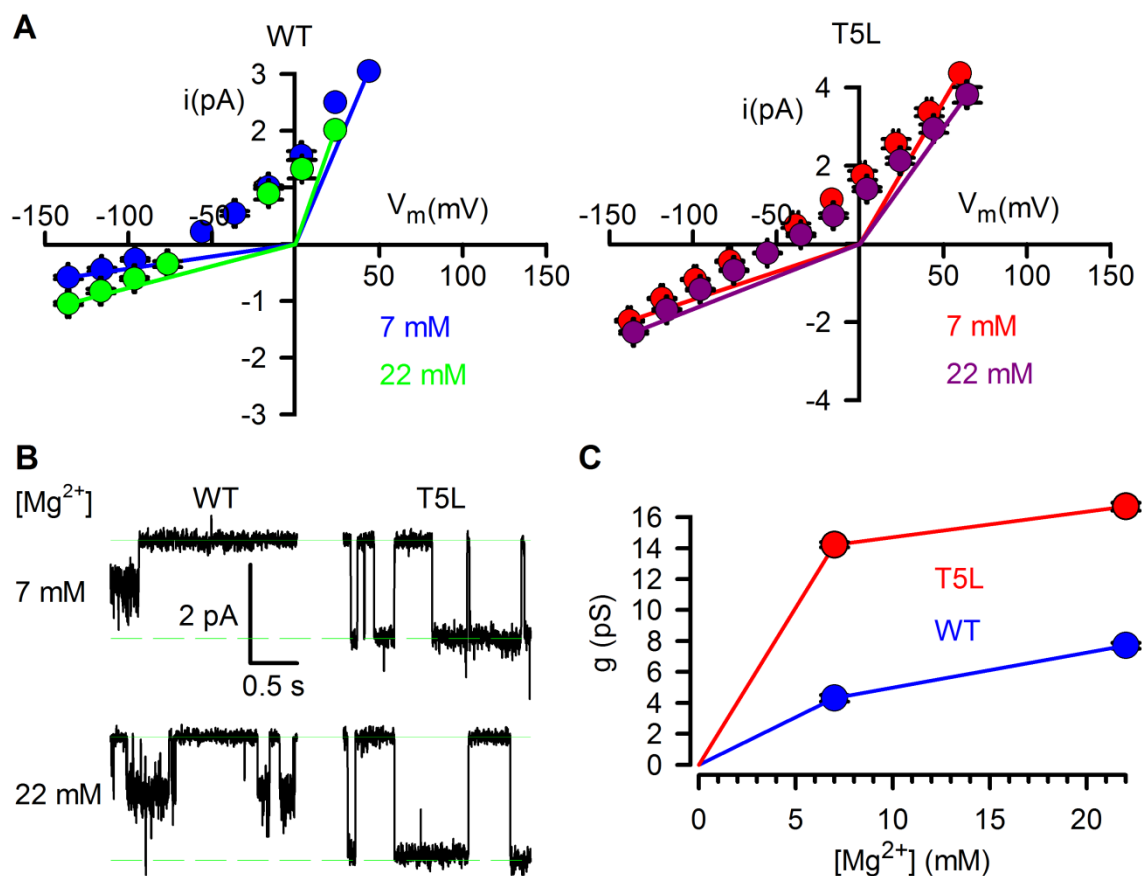
D, A vad típusú (kék) és a T5L (piros) csatorna vezetőképességének Ca^{2+} koncentrációfüggése. A vezetőképességet az egyes kationok áram-feszültség összefüggéseinek (A és B ábra) legnegatívabb pontját az origóval összekötő egyenes meredekségeként adtuk meg (lásd: 3.4.4.3. fejezet). A görbék a Michaelis-Menten egyenlettel történt illesztést reprezentálják.

Mivel a méréseinkhez használt oldatok tartalmaznak kis mennyiségű (0,5 illetve 2 mM) Mg^{2+} -ot, ami jelentős permeabilitás esetén akár torzíthatta is fenti eredményeinket, ezért összehasonlítottuk a csatornák Mg^{2+} vezetőképességét is. Ehhez a Ca^{2+} -nál már alkalmazott protokollt használtuk (29. ábra). Bár csak két Mg^{2+} koncentrációt próbáltunk ki (7 mM és 22 mM), néhány következtetést e mérések alapján is levonhattunk. Egyrészt a T5L csatornák vezetőképessége Mg^{2+} -mal szemben is jelentősen nagyobb a vad típusénál. Másrészt, a Mg^{2+} permeációjának sebessége mindkét csatorna esetében körülbelül 30 %-kal kisebb, mint azonos koncentrációjú Ca^{2+} -é, ezért a korábbi méréseink során jelenlévő, csekély mennyiségű Mg^{2+} érdemben nem befolyásolhatta azok eredményeit. Végül, a 29. B ábrán még egy érdekes jelenség figyelhető meg: a vad típusú csatornákkal készült mérések sokkal "zajosabbak", ami arra utal, hogy a Mg^{2+} a permeáció közben részlegesen blokkolja is ezeket a csatornákat.

Végül kíváncsiak voltunk, hogy a fenti hatásokért a T5L csatornában található három mutáció közül melyik milyen mértékben felelős, ezért megvizsgáltuk a másik három pórusmutáns – G984D, Y985E és G984D/Y985E – konduktanciáit is. Meglepő módon, mindhárom csatorna vezetőképességének $[Na^+]$ -függése hasonlóan mutatkozott a T5L mutánséhoz (30. A és B ábra), sőt 12 mM Ca^{2+} -mal szemben mért vezetőképességük is összemérhető volt a T5L-ével (30. C ábra). Tehát szemben az inaktivációra gyakorolt hatással, amelyben jelentős különbség mutatkozott a négy pórusmutáns között, a T5L-hez hasonló permeációs tulajdonságok eléréséhez elegendő már egy negatív töltésű aminosav bevitele is a -2' vagy -3' pozícióba.

4.3.6. Vad típusú és T5L mutáns csatorna pórusméretének összehasonlítása

Az ioncsatornák pórusának legszűkebb pontja általában a szelektáló filternél található, amelyeknek átmérője azonban nagyon változó lehet: káliumszelektív csatornáknál $\sim 3,5$ Å (71,168), míg egyes TRP csatornák esetében akár 10 Å is (169). Ebben a régióban lecserélt aminosav oldalláncok jelentősen megváltozathatják ezt a keresztmetszetet. Például a vad típusú TRPV6 csatorna becsült pórusátmérője 5,4 Å, ezzel szemben a D541G mutánsé – amelyben a viszonylag nagy, negatív töltésű aszpartát oldalláncot eltűntették – már 6,6 Å (170). Mivel a T5L csatorna is a szelektáló

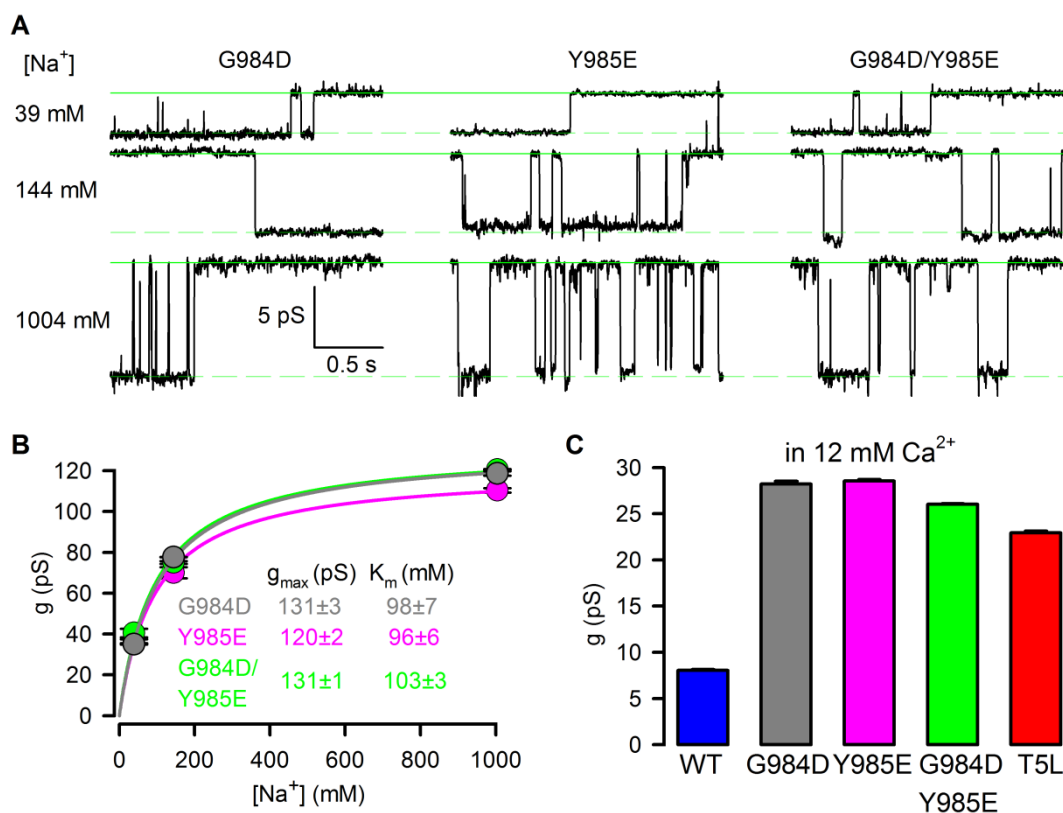


29. ábra: A T5L mutáns és a vad típusú TRPM2 csatorna Mg²⁺ iránti vezetőképességének összehasonlítása.

A, A vad típusú (bal) és a T5L (jobb) csatorna egyedi csatorna áramának feszültségfüggése 7 és 22 mM Mg²⁺ extracelluláris és 140 mM Na⁺ intracelluláris alkalmazása mellett. Az egyedi csatorna áramokat 3.4.4.3. fejezetben leírtak szerint határoztuk meg.

B, ~-135 mV-on mért befelé irányuló egyedi csatorna áramok a vad típusú (bal) és a T5L (jobb) csatorna esetében. A mérések során a pipettaoldat kationként 7, illetve 22 mM Mg²⁺-ot, míg a kádoldat 140 mM Na⁺-ot tartalmazott. A vad típusú csatornák "zajos" egyedi csatorna árama arra utal, hogy a permeáló Mg²⁺ ionok blokkolhatják a pórust.

C, A vad típusú (kék) és a T5L (piros) csatorna vezetőképességének Mg²⁺ koncentrációfüggése. A vezetőképességet az egyes kationok áram-feszültség összefüggéseinek (B ábra) legnegatívabb pontját az origóval összekötő egyenes meredekségeként adtuk meg (lásd: 3.4.4.3. fejezet)



30. ábra: A G984D, Y985E és a G984D/Y985E pórusmutánsok Na⁺ és Ca²⁺ iránti vezetőkésége.

A, A membrán két oldalán szimmetrikusan 39 (fent), 144 (középen) és 1004 (lent) mM Na-glutamátot tartalmazó oldatokban, ~ -80 mV-on mért befelé irányuló egyedi csatorna áramok a G984D (bal), a Y985E (közép) és a G984D/Y985E (jobb) csatorna esetében.

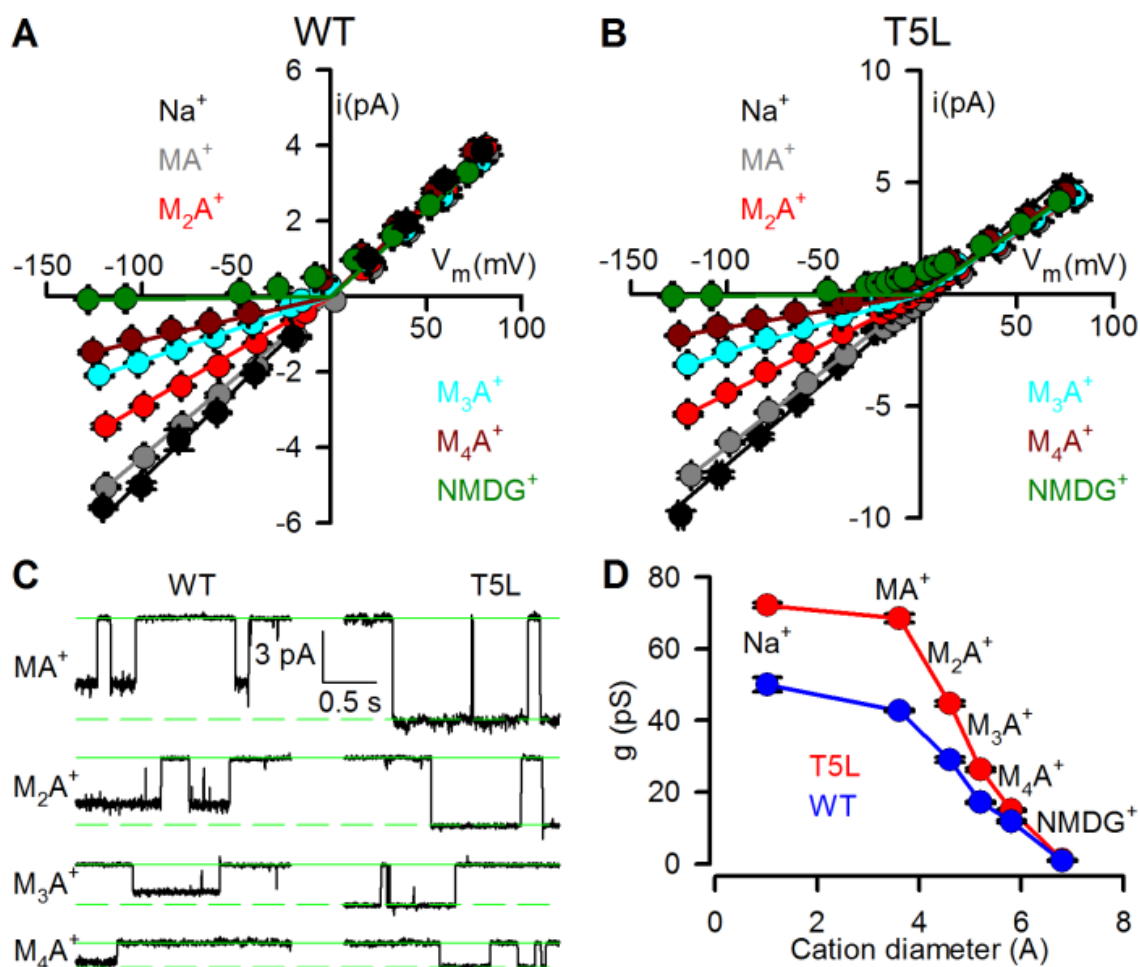
B, A G984D (szürke), a Y985E (rózsaszín) és a G984D/Y985E (zöld) csatorna Na⁺ iránti vezetőképességének koncentráció-függése. A szimmetrikus elrendezés miatt az egyes Na⁺ koncentrációkhoz tartozó vezetőképesség értékeket az áram-feszültség összefüggés pontjaira illesztett egyenes meredekségével adtuk meg (lásd: 3.4.4.3. fejezet). A görbék a Michaelis-Menten egyenlettel történt illesztést reprezentálják.

C, A vad típusú (kék) és a négy mutáns (G984D - szürke; Y985E - rózsaszín; G984D/Y985E - zöld; T5L - piros) csatorna Ca²⁺ iránti vezetőképességének összehasonlítása. A mérések során a pipettaoldat kationként 12 mM Ca²⁺-ot, míg kádoldat 140 mM Na⁺-ot tartalmazott. Az egyes csatornák vezetőképességét az áram-feszültség összefüggéseik legnegatívabb pontját az origóval összekötő egyenes meredekségeként adtuk meg (lásd: 3.4.4.3. fejezet).

filterben tartalmaz mutációkat, kíváncsiak voltunk, hogy ezek befolyásolták-e a pórus nagyságát. A pórus méretét a legnagyobb, még éppen permeáló kation átmérőjével jellemeztük. E mérések során aszimmetrikus elrendezést használtunk: a kádoldat 140 mM Na⁺-ot tartalmazott, míg az extracelluláris felszint érő pipettaoldatban különböző méretű szerves kationokat használtunk, szintén 140 mM-os koncentrációban. Ilyen körülmények között a negatív feszültségeken befelé folyó egyedi-csatorna áram (31. C ábra) a vizsgált kation permeációjának sebességét tükrözi. Ezért mindegyik kationhoz elkészítettük a hozzá tartozó áram-feszültség összefüggést (31. A és B ábra), majd a vezetőképességet a Ca²⁺-permeációnál leírt módon határoztuk meg. A kapott konduktancia értékeket a kationok átmérőjének függvényében ábrázoltuk (31. D ábra). Bár a T5L csatorna vezetőképessége minden kation esetében nagyobb volt a vad típusénál, mindkét típusú pórus vezetőképességi görbéje 7 Å körüli kation átmérőnél enyészik el. Tehát, a TRPM2 pórus átmérője ~ 7 Å, és a T5L pórusmutációk nem befolyásolják a méretét.

4.3.7. Az extracelluláris Ca²⁺ hatása a T5L csatorna kapuzására

Kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányában igazolta, hogy a TRPM2 csatorna intracelluláris Ca²⁺ elvonását követő gyors záródása (25. C ábra) jelentősen lassul, ha az extracelluláris oldat 1 mM szabad Ca²⁺-ot tartalmaz (32. A ábra, bal oldali áramgörbe) (52). Ez a hatás feszültségfüggő: az extracelluláris Ca²⁺ jelenléte annál jobban lassítja a záródást, minél negatívabb a membránpotenciál, vagyis minél nagyobb a Ca²⁺ beáramlás hajtóereje. E jelenség legkézenfekvőbb magyarázata, hogy a csatornát aktiváló Ca²⁺ kötőhelyek – bár kimutatták róluk, hogy intracellulárisan helyezkednek el (52) – a pórus közvetlen közelében találhatóak: a beáramló Ca²⁺ így mindaddig telítésben tudja tartani őket, amíg a pórus nyitva van, még akkor is, ha a membrán intracelluláris felszínét folyamatosan Ca²⁺-mentes oldattal mossuk (52). Ez a modell azt jósolja, hogy az extracelluláris Ca²⁺ hatása még kifejezett lehet a T5L mutáns esetében, hiszen az a néhány mM-os koncentráció tartományban lényegesen jobban vezeti a Ca²⁺-ot, mint a vad típusú csatorna (28. D ábra). E feltevés tesztelése céljából összehasonlítottuk a vad típusú és a T5L mutáns intracelluláris Ca²⁺ elvonást követő záródási sebességeit -120 és -20 mV között, miközben pipettaoldatunk a 140 mM Na⁺

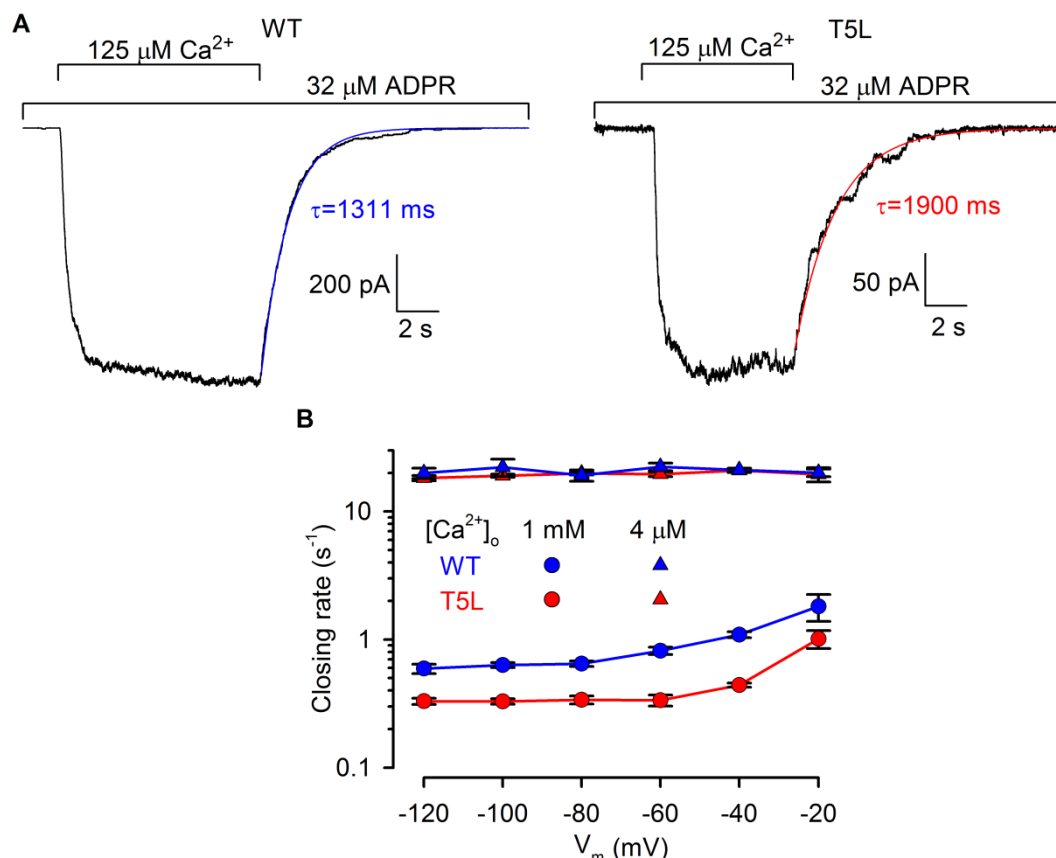


31. ábra: A T5L mutáns és a vad típusú TRPM2 pórusméretének összehasonlítása.

A és B, A vad típusú (**A**) és a T5L (**B**) csatorna egyedi áramának feszültségfüggése különböző méretű kationok (színekkel) extracelluláris alkalmazása mellett. MA^+ : metil-amin; M_2A^+ : dimetil-amin; M_3A^+ : trimetil-amin; M_4A^+ : tetrametil-amin; NMDG^+ : N-metil-D-glukamin. Az egyedi csatorna áramokat a 3.4.4.3. fejezetben leírtak szerint határoztuk meg.

C, ~ -130 mV-on mért befelé irányuló egyedi csatorna áramok a vad típusú (bal) és a T5L (jobb) csatorna esetében. A mérések során a pipettaoldat a jelzett kation ~ 140 mM-os oldatát tartalmazta, míg a kádoldatban minden esetben 140 mM Na^+ volt.

D, A vad típusú (kék) és a T5L (piros) csatorna különböző kationok iránti vezetőképességének ionátmérő-függése. A vezetőképességet az egyes kationok áramfeszültség összefüggéseinek (**A** és **B** ábra) legnegatívabb pontját az origóval összekötő egyenes meredekségeként adtuk meg (lásd: 3.4.4.3. fejezet)



32. ábra: A T5L megnövekedett Ca^{2+} permeabilitásának funkcionális következménye.

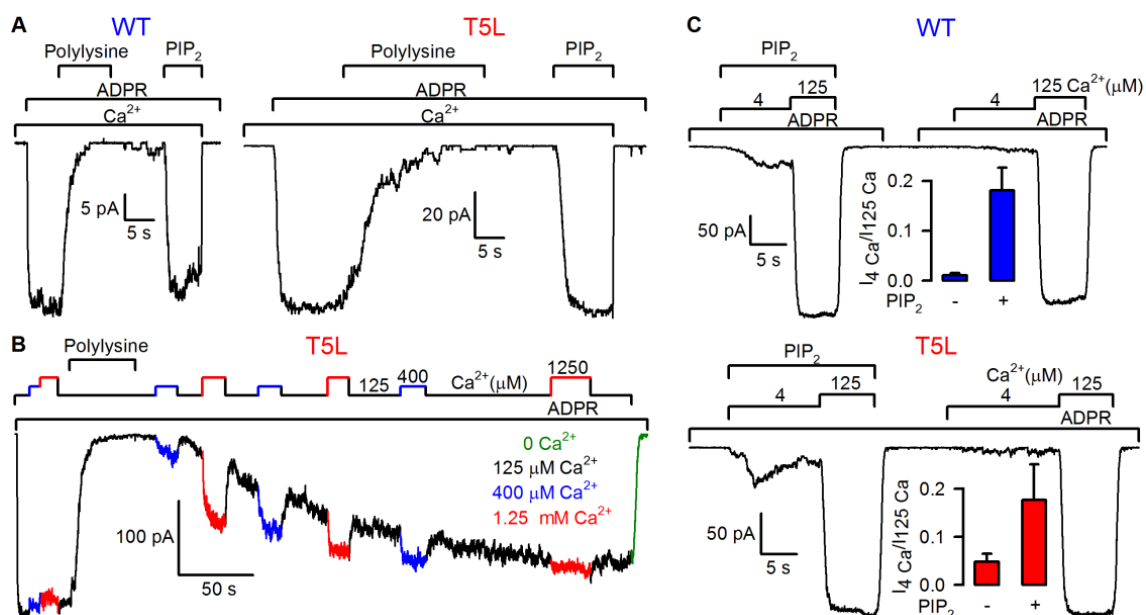
A, Az extracelluláris Ca^{2+} hatása a vad típusú (bal) és a T5L (jobb) csatorna záródására az intracelluláris Ca^{2+} hirtelen elvonását követően. A csatornákat -60 mV-os membránpotenciál mellett telítési ADPR-zal és Ca^{2+} -mal aktiváltuk. 1 mM extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében az intracelluláris Ca^{2+} elvonásakor a csatornák csak lassan csukódtak be (vö. 25C. ábra). A záródási sebesség jellemzéséhez a áramgörbékre exponenciálist illesztettünk (kék és piros vonal)

B, A vad típusú (kék görbék) és a T5L (piros görbék) csatornák intracelluláris Ca^{2+} elvonást követő záródási sebességének feszültségfüggése, amit a csökkenő makroszkópos áram időállandójának reciprokaként adtunk meg. 4 μM extracelluláris Ca^{2+} mellett (háromszögek) a csatornák a feszültségtől függetlenül gyorsan bezáródtak, míg 1 mM extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (körök), negatív membránpotenciálokon, a csukódás jóval lassabb volt. Utóbbi esetben a T5L csatornák záródási sebessége, megnövekedett Ca^{2+} vezetőképességüknek megfelelően, minden negatív membránpotenciálon szignifikánsan kisebb volt a vad típusú csatornákénál.

mellett, 1 mM szabad Ca^{2+} -ot is tartalmazott (32. A ábra, jobb oldali áramgörbe). Ilyen körülmények között a T5L csatornák záródása szignifikánsan lassabb volt a vad típusénál (32. B ábra, körök), a teljes vizsgált membránpotenciál tartományban. Ezzel szemben, ha az extracelluláris oldat nem tartalmazott Ca^{2+} -ot, akkor mindkét típusú csatorna záródása a feszültségfüggetlen, és körülbelül egyformán gyors volt (32. B ábra, háromszögek). Méréseink tehát igazolták a modell jóslatait.

4.4. A PIP_2 szerepe a TRPM2 csatorna működésében

A PIP_2 a TRPM család számos tagjának működését befolyásolja (108,163,164). Bár eredményeink szerint a TRPM2 inaktivációjában nem játszik szerepet (23. A ábra, alsó áramgörbe), más esetleges hatása nem zárható ki. Ezért megvizsgáltuk, hogy a polilizin, egy ismert PIP_2 "antagonista", befolyásolja-e a TRPM2 áramot. A polilizin nagyméretű polikation, amely töltései révén képes elfedni a membrán belső rétegében található PIP_2 molekulák negatív töltésű foszfo-inozitol csoportjait (171), csökkentve az ioncsatornák számára hozzáférhető szabad PIP_2 mennyiségét. Azt tapasztaltuk, hogy magas koncentrációjú (15 $\mu\text{g/ml}$) polilizin perfúziójára a vad típusú TRPM2 csatornák árama gyorsan csökken, azonban a polilizin elvonása után $\text{diC}_8\text{-PIP}_2$ -vel helyre lehet állítani ezt az áramot (33. A ábra, bal oldali áramgörbe). Ez arra utal, hogy a polilizin gátló hatása valóban a PIP_2 depléciójának következménye, vagyis a membrán szabad PIP_2 tartalmának teljes "maszkolása" a TRPM2 csatorna aktivációs kapujának záródásához vezet. Fontos megjegyezni, hogy polilizin jelenlétében a nem inaktiválódó T5L csatornák is ugyanígy viselkednek (33. A ábra, jobb oldali áramgörbe), ami azt mutatja, hogy a T5L pórusmutáció nem befolyásolja a PIP_2 hatását az aktivációs kapura. A polilizin gátló hatása reverzibilis, a szabad polilizin elmosása után a csatornák $\text{diC}_8\text{-PIP}_2$ alkalmazása nélkül is lassan, néhány perces időállandóval, újra aktiválódnak (33. B ábra). Ezt a folyamatot – amely valószínűleg a PIP_2 -höz kötött polilizin lassú disszociációját tükrözi – csak a T5L mutáns segítségével tudtuk vizsgálni, mert a vad típusú csatornák inaktivációja nem tesz lehetővé ilyen hosszú méréseket. Kísérleteink arra is rávilágítottak, hogy a PIP_2 depléciónak a csatorna Ca^{2+} iránti látszólagos affinitását csökkenti. Amíg kontroll körülmények között 125 μM Ca^{2+} maximálisan aktiválja a T5L mutánst ($K_{1/2} \sim 30 \mu\text{M}$, 25. D ábra; vö. 33. B ábra kezdeti szakasza), addig



33. ábra: A PIP₂ hatása a TRPM2 csatorna kapuzására.

A, Magas koncentrációjú (15 μg/ml) polilizin gátolja a 125 μM Ca²⁺ és 32 μM ADPR által aktivált vad típusú (bal) és T5L (jobb) csatornák áramát. A polilizin elvonása után 50 μM diC₈-PIP₂-vel a csatornák reaktiválhatók.

B, Rövid (15 μg/ml) polilizin kezelést követően a T5L csatornák PIP₂ adása nélkül is reaktiválódnak. Magas Ca²⁺ koncentrációk (400 μM és 1,25 mM) használata (kék és piros szakaszok) szemlélteti, hogy a polilizin drámai módon csökkenti a csatorna Ca²⁺ iránti látszólagos affinitását, ami csak lassan (percekkel a polilizin elvonását követően) áll helyre.

C, 4 μM Ca²⁺ relatív aktiváló hatása a vad típusú és a T5L csatornákra 50 μM diC₈-PIP₂ jelenlétében és hiányában (32 μM ADPR mellett). Az oszlop diagramok az ilyen körülmények között mért áramok átlagát mutatják a 125 μM Ca²⁺-mal kiváltott maximális áramértékhez normalizálva.

polilizinnel történő bezárásukat követően jóval magasabb $[Ca^{2+}]$ -ra van szükség a csatornák újraindításához: közvetlenül a polilizin elmosása után 1,25 mM Ca^{2+} is csak körülbelül fél-maximális áramot váltott ki (33. B ábra középső szakasza). Ugyanakkor az áram lassú reaktivációja során a Ca^{2+} érzékenység is helyreállt (33. B ábra végső szakasza). Ennek fényében azt is megvizsgáltuk, hogy PIP_2 adásával – előzetes polilizin kezelés nélkül – vajon növelhető-e a TRPM2 Ca^{2+} affinitása. Ahogy az 33. C ábrán látható, 50 μ M diC_8 - PIP_2 alkalmazása szignifikánsan ($P < 0,02$) növelte 4 μ M Ca^{2+} relatív aktiváló hatását mind a vad típusú (felső áramgörbe), mind a T5L (alsó áramgörbe) csatorna esetében. Ez alátámasztja, hogy nagy koncentrációjú PIP_2 , ha csak kis mértékben is, de növeli a TRPM2 csatornák Ca^{2+} iránti látszólagos affinitását.

5. Megbeszélés

5.1. Anionok és klorid csatorna

Már korábban bizonyítást nyert, hogy *Xenopus* petesejteken végzett izolált membrános mérésekben a Cl⁻ ionokat glukonáttal helyettesítve kiküszöbölhető a zavaró háttér Cl⁻ áram (52). A glukonát magas Ca²⁺ iránti affinitása (K_d ~ 20 mM) és Ca²⁺ sójának viszonylag rossz oldékonysága, azonban korlátozza az alkalmazásával elérhető maximális szabad Ca²⁺ koncentrációt, ezért az egyedi TRPM2 csatornák Ca²⁺ konduktanciájának vizsgálata céljából megpróbáltunk a Cl⁻ ionok helyettesítésére egy alkalmasabb aniont keresni.

Hasonló mérete, de ikerionos szerkezete miatt a glutamát jó alternatívának tűnt. Izolált membrános méréseink egyértelműen igazolták, hogy a *Xenopus* petesejtek endogén Ca²⁺ aktivált Cl⁻ csatornái a glukonáthoz hasonlóan, a glutamatra sem permeábilisak, vagyis ezzel az anionnal is kiküszöbölhető a Cl⁻ áram. Emellett fluorimetriás mérésekkel a glutamát Ca²⁺ iránti affinitását is meghatároztuk, amely a glukonátra jellemző érték körülbelül egynegyedének adódott (K_d = 77,5±2,5 mM), így a glutamát Ca²⁺-os oldataiban magasabb szabad Ca²⁺ szint érhető el, ami a Ca²⁺ konduktancia meghatározásánál előnyös. Ráadásul, a glutamát szabad sav formában is kapható, így tetszőleges kationnal kombinálható, ami szintén hasznos volt a TRPM2 csatorna permeabilitási tulajdonságainak vizsgálatakor.

5.2. A TRPM2 csatorna közvetlen és közvetett modulátorai

Már a korai tanulmányok felismerték, hogy a csatorna két fő aktivátora az ADPR és az intracelluláris Ca²⁺ (50,76,77,137). Hamarosan az is kiderült, hogy a TRPM2 csatornát kifejező sejtek érzékenyebbek az oxidatív stresszel szemben (98,118,172), ezért azóta számos csoport vizsgálta a reaktív oxigén származékok és az ADPR aktiváló hatása közötti kapcsolatot (95-97,100,101,112-114,117,173,174). Ezzel párhuzamosan számos adenin nukleotid származékról (cADPR, AMP, NAD⁺, NAADP, O-acetilált-ADPR) mutatták ki, hogy lehetséges TRPM2 szabályozó molekula (101-104,119). Ugyanakkor a leírt hatások gyakran ellentmondásosak voltak, különösen a

H₂O₂ és a cADPR esetében. De nem csak a hatás tekintetében nem volt egyetértés, hanem a molekulák látszólagos affinitásában sem, hiszen a különböző tanulmányok több nagyságrenddel eltérő értékeket közöltek. Ezeknek az ellentmondásoknak a legfőbb oka az lehet, hogy ezekben a tanulmányokban egészszejtes méréseket használtak, ami korlátozza a különböző mediátorok intracelluláris koncentrációjának pontos beállítását, hiszen a sejtalkotók jelenléte miatt ezek az anyagok átalakulhatnak, lebomolhatnak, de akár más anyagok termelését, vagy kompartmentalizációját is befolyásolhatják. Ezen munkák alapján ezért az sem dönthető el, hogy e vizsgált regulátorok közvetlenül a TRPM2 csatornához kötődve, vagy közvetett úton, az elsődleges aktivátorok – Ca²⁺ és ADPR – lokális koncentrációjának megváltoztatása révén, hatnak. További bizonytalanságot okoz, hogy több kereskedelmi forgalomban kapható nukleotidról igazolták, hogy szennyezésként jelentős mennyiségű ADPR-t is tartalmaz (103,105). Az általunk használt izolált membrános inside-out technika ideális körülményeket teremt ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására, mert az intracelluláris oldat szabad perfúziója révén pontosan kontrollálhatjuk az alkalmazott anyagok koncentrációját. Emellett egy membránfolton ugyanazt a molekulát több különböző koncentrációban is alkalmazhatjuk, illetve eltérő modulátorok egymás utáni perfúziójával azok aktiváló / gátló képességeit is összehasonlíthatjuk. Így egyértelműen eldönthető, hogy egy adott anyag közvetlen vagy közvetett úton befolyásolja-e a TRPM2 csatorna működését, illetve pontosan meghatározható a látszólagos affinitása és hatékonysága.

5.2.1. Az adenosin-difoszfó-ribóz (ADPR) és a Ca²⁺

Az ADPR hatását már izolált membrános mérésekben is vizsgálták (52), és igazolták, hogy közvetlen módon aktiválja a TRPM2 csatornákat. E mérésekből az is kiderült, hogy látszólagos affinitása nagyobb ($K_{1/2} \sim 1 \mu\text{M}$), mint amit a korábbi egészszejtes kísérletek alapján becsültek (102,104). Bár ez a tanulmány főként a Ca²⁺ szerepére koncentrált, és az ADPR hatását csak telítési [Ca²⁺] mellett vizsgálta, az eredmények alapján egyértelmű volt, hogy a Ca²⁺ és az ADPR eltérő kötőhelyekkel rendelkezik, és így közvetlenül nem befolyásolják egymás kötődését. Az egyéb modulátorokkal kapcsolatban azonban ilyen adatok nem álltak rendelkezésre. Ezekkel

kapcsolatban felmerült, hogy esetleg a Ca^{2+} -mal azonos mechanizmussal hatnának, s így a telítési $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elfedhetné a hatásukat. Ezért e modulátorok hatását féltelítési (15 μM) Ca^{2+} koncentráció mellett is meg akartuk vizsgálni, és ehhez szükség volt egy ilyen körülmények között nyert ADPR kontrollra. Méréseink (16. A, B és C ábra) igazolták, hogy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lényegesen nem befolyásolja az ADPR iránti látszólagos affinitást, és ahogy későbbi kísérleteinkből kiderült, a többi modulátor hatását sem.

Az egészséjtes kísérletekkel szemben, az izolált membrános mérésekben makroszkópos áramok előidézéséhez magas – 10 μM -nál nagyobb – $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra volt szükség. Ennek az ellentmondásnak az egyik magyarázata lehet, hogy a patch kiszakítása során elvesz a magas affinitású Ca^{2+} kötőhely. Erre legkézenfekvőbb jelöltünk a kalmodulin volt, amelyről már korábban igazolták, hogy ko-precipitálható a TRPM2 csatornával (69). Azonban méréseink szerint a kalmodulin jelenléte a membrán intracelluláris oldalát perfundáló oldatban nem növelte meg a csatorna Ca^{2+} iránti affinitását (16. D és E ábra). A hatás elmaradásának két magyarázata lehet: vagy a kalmodulin nem befolyásolja a Ca^{2+} TRPM2-t aktiváló hatását, vagy az endogén kalmodulin olyan erősen kötődik a csatornához, hogy kiszakítás után sem disszociál. Mindenesetre az izolált membránban tapasztalt alacsony Ca^{2+} affinitást nem a kalmodulin elvesztése okozza. Végül azt próbáltuk ki, hogy magas (1 mM) ADPR koncentráció alkalmazásával csökkenthető-e a csatorna Ca^{2+} igénye, de 1 μM Ca^{2+} mellett még ilyen körülmények között is csak elenyészően kicsi aktivitást kaptunk (16. F ábra).

Összegezve, a csatorna ADPR iránti látszólagos affinitását az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lényegesen nem befolyásolja. Mindkét vizsgált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (15 és 125 μM) mellett 32 μM ADPR már telítési koncentrációt jelent, így további méréseinkben ezt a koncentrációt használtuk kontrollnak. Továbbá a csatorna aktivációjának magas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ igénye sem kalmodulin, sem magas koncentrációjú ADPR alkalmazásával nem csökkenthető.

5.2.2. A hidrogén-peroxid (H_2O_2)

A membrán intracelluláris oldalát közvetlenül perfundáltuk magas koncentrációjú (1mM) H_2O_2 -dal, azonban még egy perc alkalmazás után sem tapasztaltunk semmilyen csatorna aktivitást (17. A és C ábra). Ennek alapján

kizárhatjuk, hogy az egészséjtes mérésekben leírt H_2O_2 -indukált TRPM2 áramért a csatorna felszíni aminosav oldalláncainak közvetlen oxidációja lenne felelős. Mivel további méréseinkben a H_2O_2 nem is gátolta a telítési koncentrációjú ADPR hatását (17. A ábra, jobb oldali áramgörbe), illetve nem befolyásolta az ADPR látszólagos affinitását sem (17. B, C és D ábra), ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy még ha a H_2O_2 oxidál is egyes aminosav oldalláncokat a TRPM2 felszínén, akkor sem valószínű, hogy ennek bármilyen funkcionális hatása lenne a csatorna kapuzására.

Ez az eredmény alátámasztja azt a korábbi modellt, amely szerint az oxidatív stressz a mitokondriumból, illetve a sejtmagból ADPR-t szabadít fel, ami azután aktiválja a TRPM2 csatornát. Ezt a modellt erősíti a miénk mellett, több megfigyelés is. Egyrészt, a DNS sérülése során aktiválódó, és együttes működésük révén ADPR termelést eredményező, PARP-1, illetve PARG enzimek gátlásával a H_2O_2 okozta TRPM2 aktiváció kivédhető volt, míg az intracellulárisan perfundált ADPR hatását ez nem befolyásolta (112,115-117). Másrészt, a mitokondriális NUDT9 enzim túlexpresszállása, amely specifikusan a mitokondriumban keletkező ADPR lebomlásához vezet, ugyancsak gátolta a H_2O_2 általi TRPM2 aktivációt (95). Bár egy tanulmány szerint az ADPR-ra érzéketlen ΔC deléciós mutáns, amelyben az ADPR-t kötő NUDT9-H domén egy része hiányzik, továbbra is aktiválható maradt H_2O_2 -vel, ezt az eredményt más nem tudta reprodukálni (97).

Összegezve, bár a szervezeten belül az oxidatív stressznek – akárcsak az egészséjtes mérések során alkalmazott H_2O_2 -nak – fontos szerepe lehet a TRPM2 csatorna aktiválásában, ez az aktiváció a lokális [ADPR] növelésén keresztül, közvetett módon valósul meg.

5.2.3. Az adenzin-monofoszfát (AMP)

A mitokondriális NUDT9 enzim az ADPR-t AMP-re és ribóz-5-P-ra bontja. Bár a NUDT9-H domén ADPR-hidroláz aktivitása a mai napig vitatott (76,103), az ADPR kötőhelyeként bizonyítottan kritikus szerepet játszik a csatorna aktivációjában (97,103). Ezért nem lenne meglepő, ha az AMP, mint az ADPRáz reakció egyik végterméke, kompetitív módon gátolná az ADPR kötődését, és így hatását is. Sőt, ITC mérések alapján az AMP valóban képes kötődni az izolált NUDT9-H doménhez. Az AMP gátló

hatása azért sem lenne példa nélküli a TRPM csatornák körében, mert az AMP a TRPM4 ismert inhibitora is (123,175), bár ez a csatorna nem tartalmazza a C-terminális enzim-domént. A TRPM2 és a TRPM4 azonban jelentős szekvencia hasonlóságot mutat az N-terminális TRPM homológia doménekben, így az is elképzelhető lenne, hogy az AMP mindkét csatornában ehhez a részhez kötődve fejtené ki gátló hatást. Egészsejtes mérésekkel több csoport is megvizsgálta az AMP hatását, de az eredmények ebben a kérdésben sem voltak egymással összhangban. Bár az AMP több tanulmányban is gátolta az ADPR, a cADPR vagy az NAADP kiváltotta TRPM2 áramot (101,102,104), az affinitások jelentősen szórtak, és megjelent olyan közlemény is, amelyben nem sikerült e gátlást kimutatni (105).

A TRPM4 csatornával ellentétben, amelyet az AMP izolált membrános mérésekben is gátolt (176), a TRPM2 esetében izolált membrános kísérleteink nem mutattak ki semmilyen gátló hatást, a többféle alkalmazott protokoll (kontroll szakaszokkal keretezett és előinkubált alkalmazás) és kísérleti körülmény (alacsony és magas $[Ca^{2+}]_i$, többféle ADPR és AMP koncentráció, ribóz-5-P-tal kombinált alkalmazás) ellenére sem (18. ábra). Ezek alapján nyilvánvaló, hogy az AMP a TRPM2 csatornát csakis közvetett módon gátolhatja. Élő sejtekben az AMP erős metabolikus jel, amely különböző utakon keresztül – például az AMP-kináz közvetítésével – számos energiatermeléshez kapcsolódó jelpályát szabályoz. Ezért nagy koncentrációjú AMP sejtbe juttatása drasztikus változásokat idézhet elő a sejt metabolizmusában. Ezek a változások akár szövetspecifikusak is lehetnek, ami megmagyarázná a különböző sejt típusokban kapott eltérő eredményeket.

Összegezve, eredményeink szerint az AMP közvetlenül nem befolyásolja a TRPM2 csatorna működését, ezért az egészsejtes mérések során tapasztalt gátlás csak közvetett módon valósulhat meg. További vizsgálatoknak kell majd eldöntenie, hogy pontosan milyen változások közvetítik ezt a gátló hatást.

5.2.4. A ciklikus adenosin-difoszfó-ribóz (cADPR)

A legtöbb egészsejtes mérésen alapuló tanulmányban a cADPR aktiválta a TRPM2 csatornákat, sőt az ADPR-zal szinergiát is mutatott (101,102,104,119). Azonban e tanulmányok közül csak egyben ellenőrizték a felhasznált cADPR

tisztaságát. Ennek során kiderült, hogy a készítmény jelentős mennyiségű ADPR szennyezést tartalmazott, és az ettől megtisztított minta már nem rendelkezett aktiváló hatással (105).

Bár a kereskedelmi forgalomban kapható cADPR a mi izolált membrános méréseinkben is aktiválta a TRPM2 csatornát (19. A és B ábra), ugyanakkor az ADPR-zal leírt szinergiát mi nem tudtuk kimutatni (19. C és D ábra). Mindkét eredményt jól magyarázza a tömegspektrometriával, illetve TLC-vel kimutatott jelentős ADPR szennyezés (20. A ábra). A gondosan megtisztított cADPR-zal a kísérleteket megismételve sem aktivációt, sem ADPR iránti szenzitizációt nem tapasztaltunk – az alkalmazott $[Ca^{2+}]_i$ -tól, illetve a kalmodulin jelenlététől függetlenül (21. ábra). Egyesek ugyan megkérdőjelezték a tisztított cADPR-zal kapott eredményeket, mert a cADPR minta ADPR szennyeződésének lebontása során azzal ekvivalens mennyiségű AMP képződik – amely egészséjtes mérésekben gátolta mind az ADPR, mind a cADPR hatását (104) –, azonban ez a kritika nem állja meg a helyét. Egyrészt, a tisztítatlan mintában lévő 20-50 %-nyi ADPR szennyezés maximum 2-5 μ M AMP jelenlétét okozhatta 10 μ M tisztított cADPR használatkor, s ez a koncentráció még egészséjtes mérésekben is csak minimális mértékben gátolta a TRPM2 áramot. Másrészt, a mi izolált membrános méréseinkben még 100 μ M AMP sem gátolt sem önmagában (18. ábra), sem ribóz-5-P-tal együtt alkalmazva. Az is a cADPR közvetlen hatása ellen szól, hogy alakja nagyon különbözik az ADPR-étól: míg utóbbi lineáris, addig a cADPR gyűrűs szerkezetű, gömbszerű molekula. Nehezen képzelhető el, hogy mindkét molekula képes legyen ugyanahhoz a kötőhelyhez kapcsolódni. Ezek fényében kizárható, hogy a cADPR – legalábbis 10 μ M-os koncentráció alatt – közvetlenül befolyásolná a TRPM2 csatorna működését. Azt is érdemes figyelembe venni, hogy míg az ADPR intracelluláris koncentrációja néhány μ M-os nagyságrendbe esik (105), ami összevethető a TRPM2 aktiváció 1 μ M-os $K_{1/2}$ értékével, addig a cADPR koncentrációja nyugalomba csak 50-500 nM, és stimuláció hatására sem emelkedik 2 μ M fölé (105,121,177). Ezért, még ha lenne is közvetlen hatása a cADPR-nak 10 μ M-nál magasabb koncentrációban, nehezen hihető, hogy egy ilyen hatásnak bármilyen fiziológiás jelentősége lenne. Az egészséjtes mérések során tapasztalt cADPR és ADPR közötti szinergiára a legvalószínűbb magyarázatnak az tűnik, hogy a cADPR a II-es vagy III-as típusú rianodin receptoron keresztül Ca^{2+} -ot mobilizál az intracelluláris

raktárból (10,12,13,120), és a lokális $[Ca^{2+}]$ növekedése fokozza az ADPR TRPM2-t aktiváló hatását. Végül az sem zárható ki, hogy a sejtbe perfundált cADPR metabolizálódik, az adenin gyűrű 1-es pozíciójú nitrogénje és a disztális ribóz közötti N1-glikozidos kötés hidrolízisével ADPR keletkezik, és ez aktiválja a csatornákat.

Összegezve, méréseink alapján a cADPR közvetlenül nem aktiválja a TRPM2 csatornát és nem befolyásolja az ADPR aktiváló képességét sem. Az egészséjtes mérésekben tapasztalt eredményekre magyarázatot adhat: a minta ADPR szennyezése, a cADPR hidrolízise ADPR-zá, illetve Ca^{2+} mobilizációval összefüggő közvetett hatás.

5.2.5. A nikotonsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP)

Az NAADP alakja az ADPR-éhoz hasonlóan lineáris. A szerkezetükben lévő két eltérés (2. ábra) ellenére az NAADP már kezdettől ígéretes TRPM2 agonistának tűnt (10,13). Az egészséjtes mérésekkel (101,102,104) összhangban, az NAADP a mi izolált membrános méréseinkben is aktiválta a TRPM2 csatornát (22. A és E ábra). Mivel NAADP törzsoldatunk esetében TLC-n nem láttuk nyomát ADPR szennyezésnek (22. F ábra), ezért a méréseink során tapasztalt aktiváció valóban a TRPM2 csatornához kötődő NAADP közvetlen hatása lehet. Ugyanakkor, egy patchen belül összehasonlítva a telítési NAADP, illetve ADPR által aktivált TRPM2 áramokat (22. A és E ábra) kiderült, hogy az NAADP-vel csak körülbelül 50%-os aktiváció érhető el. Vagyis az NAADP parciális agonista. Ráadásul affinitása is két nagyságrenddel kisebb ($K_{1/2} \sim 100 \mu M$), mint az ADPR-é ($K_{1/2} \sim 1 \mu M$). Figyelembe véve, hogy az NAADP fiziológiás koncentrációja 4-60 nM (13,178,179), ami 3 nagyságrenddel kisebb, mint az aktiváláshoz szükséges koncentráció, ezért valószínűtlen, hogy e direkt hatásának a csatorna fiziológiás szabályozásában szerepe legyen. Ugyanakkor, szemben az egészséjtes kísérletekkel, amelyek jelentős szinergiát mutattak ki az ADPR és az NAADP között (102,104), a mi izolált membrános méréseinkben ezek csak minimális mértékben befolyásolták egymás látszólagos affinitását (22. B, C, E és G ábra). Figyelembe véve, hogy az NAADP jól ismert, hatékony intracelluláris Ca^{2+} mobilizáló másodlagos hírvivő (35,43,44,180,181), úgy gondoljuk, hogy a sejtekben tapasztalt szinergia az NAADP-aktiválta TPC csatornákon keresztül a lizozómális

kompartmentből történő Ca^{2+} felszabadulás (46-48,182), és a következményes lokális $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedés, okozta TRPM2-aktivációt tükrözi.

Összegezve, eredményeink alapján az NAADP a TRPM2 csatorna parciális agonistája, azonban fiziológias körülmények között a közvetlen aktivációnál sokkal lényegesebb lehet, a lokális Ca^{2+} koncentráció befolyásolásán keresztül megvalósuló közvetett hatása.

5.2.6. A nikotinsav-adenin-dinukleotid (NAAD)

Kísérleteinkben megmutattuk, hogy az NAADP képes aktiválni a TRPM2 csatornákat, és a szerkezeti rokonság alapján feltételezzük, hogy e hatását az ADPR-hoz hasonlóan a NUDT9-H doménhez kapcsolódva fejtí ki. Alacsonyabb látszólagos affinitása és kisebb hatásossága pedig a járulékos foszfát és nikotinsav csoport jelenlétének köszönhető. Ezért úgy gondoltuk, hogy az NAADP defoszforilált formája, az NAAD, amely szerkezetiileg közelebb áll az ADPR-hoz, valószínűleg az NAADP-nél jobb agonista lehet. Eredményeink igazolták is várakozásainkat (22. D és E ábra). Az NAAD látszólagos affinitása ~ 3 -szorosa az NAADP-ének, és telítési koncentráció mellett mért maximális aktiváló képessége is jelentősen magasabb. Ugyanakkor ezek az értékek még mindig elmaradnak az ADPR-étől. Tehát, bár az NAADP 2'-foszfát csoportjának eltávolítása javította mind a molekula affinitását a csatornához, mind az aktiváló képességet, a nikotinsav jelenléte miatt az illeszkedés az NAAD esetén sem tökéletes. Ezen eredményeink összhangban vannak a homológ NUT9 kristályszerkezete alapján készített NUDT9-H szerkezeti modellel (95).

Bár egészségjes rendszerekben az NAAD hatását eddig nem vizsgálták, érdekes lenne megvizsgálni, hogy vajon ez esetben is kimutatható-e szinergia az ADPR-zal. Eredményeink alapján ugyanis az NAAD közvetlen, a TRPM2 csatornára kifejtett, hatása hasonló az NAADP-éhez, azonban azzal ellentétben az NAAD nem képes Ca^{2+} -ot mobilizálni az intracelluláris raktárakból (183). Ezért a szinergia esetleges hiánya egyértelmű bizonyíték lehetne amellet, hogy az NAADP közvetett, ADPR érzékenységet fokozó hatása a lokális $[\text{Ca}^{2+}]$ megemeléseinek köszönhető.

Összegezve, eredményeink szerint az NAAD a TRPM2 csatorna parciális agonistája. Affinitása és aktiváló képessége – szerkezetének megfelelően – az NAADP-é és az ADPR-é közé tehető.

5.2.7. A nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺)

Továbbra is nyitott kérdés, hogy a NAD⁺ valódi aktivátor-e. Az egészséjtes mérések ebben a vonatkozásban is ellentmondásosak. Számos tanulmányban a NAD⁺ is képes volt a TRPM2 csatornák aktiválására (77,96,98,101,113,118), azonban mások ilyen hatást nem találtak (76,97). A kérdést eldöntendő, mi is szeretnénk volna megvizsgálni a NAD⁺ hatását izolált membrános rendszerünkben, de a TLC jelentős ADPR szennyezést mutatott ki NAD⁺ törzsoldatunkban, lehetetlenné téve ezt számunkra (22. F ábra).

Fiziológiás szempontból jelentős közvetlen hatás ellen szól, hogy a TRPM2 aktivációhoz 1 mM feletti NAD⁺ koncentrációra volt szükség, ami – figyelembe véve a már mások által is kimutatott ADPR szennyezést (101,103) – akár műtermék is lehet. Ráadásul, a hatás legtöbbször csak jelentős késéssel jelentkezett, ami felveti, hogy ezekben a mérésekben a valódi aktivátor nem is a NAD⁺, hanem annak valamely metabolitja – például a hidrolízisével keletkező ADPR – lehetett. Ezzel szemben a közvetlen hatás mellett szól, hogy a szerkezetileg hasonló NAAD is képes volt aktiválni a TRPM2 csatornát. Alacsony affinitása ellenére a NAD⁺ hatásának élettani jelentőségét az adhatja, hogy a többi modulátorral szemben a NAD⁺ citoplazmatikus koncentrációja viszonylag magas, 200-350 μ M (98), és még tovább emelkedhet, például a mitokondriumok sérülésekor.

5.3. A TRPM2 csatorna irreverzibilis inaktivációjának kiküszöbölése

A TRPM2 csatorna kapuzásának részletes megismeréséhez elengedhetetlen lenne a steady-state egyedi csatorna mérések elemzése. A vad típusú csatorna gyors inaktivációja azonban nagyon korlátozza az ilyen megfigyelések lehetőségét. Ezért legfontosabb célunk az inaktiváció háttérében álló molekuláris mechanizmus feltárása és e folyamat lassítása – megszüntetése – volt.

5.3.1. Az inaktiváció molekuláris mechanizmusának vizsgálata

A vad típusú TRPM2 csatornák kizsakítás utáni inaktivációja kinetikailag egyetlen lépéssel jellemezhető, amelynek során az addig magas nyitvatartási valószínűséggel kapuzó egyedi csatorna hirtelen irreverzibilisen zárt állapotba kerül (52). E folyamat kinetikája emlékeztet a K^+ csatornák alegységei között a C-típusú inaktiváció során megfigyelhető nagyfokú kooperativitásra (184,185). Emellett méréseink igazolták, hogy a C-típusú inaktivációhoz hasonlóan a TRPM2 inaktivációja is állapotfüggő – zárt csatornában közel tízszer lassabb, mint nyitottakban – és érzékeny a permeáló ionok fajtájára és koncentrációjára (23. ábra) (vö. (186)). Továbbá kizártunk számos mechanizmust, amelyről felmerült, hogy befolyásolhatná a csatorna inaktivációját, mint például a kalmodulin elvesztése, a PIP_2 bomlása, vagy kritikus oldalláncok közvetlen oxidációja. Összességében ezek az eredmények felvetették annak lehetőségét, hogy a TRPM2 áramának fogyása – a feszültségfüggő K^+ csatornák C-típusú inaktivációjához hasonlóan – a szelektáló filter konformáció változásának következménye lehet. Vagyis a TRPM2-ben az ADPR és Ca^{2+} által szabályozott aktivációs kapu mellett, amelyet a K^+ csatornákkal feltételezett szerkezeti homológia és az aktiváló ligandok kötőhelyeinek intracelluláris lokalizációja alapján valószínűleg a 6. TM-szakasz citoszólikus vége alkothat, létezik egy ettől független, a szelektáló filterhez kapcsolható, inaktivációs kapu is.

5.3.2. A pórusmutánsok és a csatorna inaktivációja

A fenti képpel összhangban, a szelektáló filtert érintő mutációk jelentősen megváltoztatták a TRPM2 inaktivációjának kinetikáját. A G984D mutánsban az alegységenként bevitt egy-egy negatív töltés a TRPM2 pórusának stabilizációjához vezetett, amelyben feltehetőleg szerepet játszott e töltések közötti elektrosztatikus taszítás is, akadályozva a filter összeesését. Bár ez a mutáns teljes mértékben inaktiválódott, e folyamat sebessége több mint egy nagyságrenddel lassult a vad típuséhoz képest (24. B ábra, G984D áramgörbe). Az Y985E esetében már összetettebb volt a hatás, ugyanis az áram körülbelül harmada tartósan megmaradt (24. B ábra, Y985E áramgörbe), ami – homogén csatorna populációt feltételezve – nem

magyarázható pusztán az inaktivációs sebesség csökkenésével. Kézenfekvő magyarázat, hogy ebben a mutánsban az inaktiváció lassulása mellett jelentősen felgyorsult – megjelent – a csatornák reaktivációja is, és a megmaradó áram e két folyamat egyensúlyaként alakult ki. Ezt támasztja alá, hogy a duplamutánsnál – amelyben -3' helyen lévő aszpartát tovább lassíthatja az inaktivációt – az áramnak még nagyobb része marad meg (24. B ábra, G984D/Y985E áramgörbe). Ugyanakkor az is nyilvánvaló, hogy a két mutáció hatása az inaktivációs sebességre energetikailag nem additív, ami arra utal, hogy a két szomszédos negatív töltésű aminosav oldallánc hatása nem független egymástól. Az elektrosztatikus taszítás mellett a pórus konformáció változásának is fontos szerepe lehet, mert a -4' pozícióból hiányzó leucin beillesztése a pórus további stabilizálásához vezetett, olyannyira, hogy az áram kiszakítás utáni csökkenése szinte teljes mértékben megszűnt (24. B ábra, T5L áramgörbe). Eredményeink egybevágóak azzal a tanulmánnyal, amelyben a TRPM4 csatorna -4' helyén található aminosav törlése ($\Delta Q980$), vagy -2' pozíciójú negatív töltés megszüntetése (D982A) – vagyis a mieinkkel ellentétes mutációk alkalmazása – a TRPM4 csatornák gyors inaktivációjához vezetett (166). Bár a TRPM2 nagyfelbontású szerkezetének hiányában nem tudunk pontos magyarázatot adni a -4' helyre inzertált leucin hatására, a K^+ (71) és más nem szelektív kation csatornák (187) meglévő kristályszerkezetei alapján a szelektáló filter stabilizációjában a környező aminosav oldalláncok kölcsönhatásain alapuló összetett hálózat vesz részt. A legtöbb esetben például megfigyelhető egy konzervált hidrogén híd a szelektáló filter C-terminális végén, a 0' helyen található invariáns aszpartát és ugyanazon alegység pórus-hélixében elhelyezkedő -13' pozíciójú tirozin (esetleg triptofán) között, amely nélkülözhetetlen a K^+ csatornák szelektivitásának és pórusstabilitásának fenntartásához (187). A vad típusú TRPM2-ben az ennek megfelelő tirozin a -12' helyen található (24. A ábra), de a T5L mutánsban a leucin inzerciója révén -13' pozícióba kerül. Elképzelhető, hogy az így bekövetkező átrendeződés révén megváltozik a tirozin oldalláncának orientációja, és helyreáll a konzervált hidrogén híd, ami a pórus stabilizációjához vezet.

5.3.3. Alkalmas-e a T5L mutáns a TRPM2 kapuzásának modellezésére?

Méréseink igazolták, hogy a T5L csatorna nem inaktiválódik, és így alkalmas steady-state egyedi csatorna mérések készítésére. Azonban a vad típusú TRPM2

modellezésére nyilván csak akkor használható, ha nem változik meg a csatorna kapuzásának mechanizmusa. Mivel a mutációk a szelektáló filterben vannak, elég távol a ligandkötő helyektől és a feltételezett aktivációs kaputól, valószínűsíthető volt a csatorna kapuzásának érintetlensége. Makroszkópos áramok segítségével ki is mutattuk, hogy a mutációk érdemben nem befolyásolták sem az ADPR, sem a Ca^{2+} aktiváló hatását (25. ábra), és a csatornák aktiváló ligandok elvonását követő záródásának kinetikája sem változott. Végül összehasonlítottuk az egyedi T5L mutáns csatornák vizsgálatával nyert átlagos kapuzási kinetikai paramétereket azokkal, amelyeket a vad típusú csatornával készült korábbi mérések elemzése alapján már publikáltak (52), de a mikroszkópos kapuzási kinetika tekintetében sem találtunk jelentős eltérést a két csatorna között (26. ábra). Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a T5L mutáció nem változtatta meg a TRPM2 csatorna ADPR/ Ca^{2+} -függő kapuzását, így a T5L mutáns alkalmas lehet az ADPR és a Ca^{2+} aktiváló mechanizmusának részletes biofizikai vizsgálatára.

5.3.4. Vad típusú és pórusmutáns csatornák permeabilitásainak összehasonlítása

Bár a T5L mutáns szelektáló filterének szekvenciája azonos a mintaként használt TRPM5 csatornáéval, meglepő módon mégsem örökölte annak egyértékű kationok iránti szelektivitását (59), sőt, kétértékű kationok iránti vezetőképessége még jelentősen növekedett is (28. és 29. ábra). Ez a tény felhívja a figyelmet arra, hogy egy csatorna szelektivitásához szükséges konformáció létrehozásában a filter szekvenciája mellett, az oldalláncok interakciója révén, jelentős szerepe van a filtert körülvevő környezetnek is. Sajnos, mivel sem a TRPM2, sem a TRPM5 esetén nem áll rendelkezésre kristályszerkezet, nehéz megjósolni, hogy a TRPM5 pórus monovalens szelektivásáért, mely konkrét aminosavak felelősek. Mindenesetre a TRPM2 T5L variánsának megnövekedett Ca^{2+} vezetőképessége funkcionális következményekkel is jár: extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében negatív membránpotenciálokban a citoszólikus Ca^{2+} elvonásakor a T5L csatornák szignifikánsan lassabban záródnak be, mint a vad típusú csatornák – pedig ilyen különbség extracelluláris Ca^{2+} hiányában nem észlelhető (32. ábra). Ez összhangban van azzal a korábbi modellel (52), amely szerint az aktivációért felelős Ca^{2+} kötőhelyek intracellulárisan, de a pórus nyílásának közvetlen közelében

helyezkednek el, ahol a nyitott póruson beáramló Ca^{2+} révén magas lokális $[\text{Ca}^{2+}]$ -t észlelnek. Mivel az extracelluláris Ca^{2+} alacsony mM-os koncentráció tartományában a T5L pórus a vad típusúnál jelentősen gyorsabban vezeti be a Ca^{2+} -ot (28. ábra), így ebben a mutánsban nyitott pórus esetén az aktiváló kötőhelyek környezetében várhatóan magasabb lokális Ca^{2+} koncentráció alakul ki, ami viszont a záródási sebesség csökkenéséhez vezet (52).

Mivel a pórus keresztmetszete általában a szelektáló filterben a legszűkebb, az itt található aminosavak cseréje pusztán az oldallánc méretváltozása révén megváltoztathatja, hogy mekkora átmérőjű ionok férnek át a csatornán (170). Bár a T5L mutáns vezetőképességét – a vad típussal összehasonlítva – minden vizsgált kation mellett nagyobbak találtuk, a 7 Å körüli NMDG⁺-t már mindkét csatorna csak nagyon kis mértékben engedte át (31. ábra). Ez alapján a T5L mutációi nem befolyásolják a pórus méretét. Figyelembe véve, hogy a bevitt aminosav oldalláncok nagyobbak az eredetiéknél (glicin → aszpartát, tirozin → glutamát), ez felveti, hogy – a K⁺ csatornához hasonlóan (71) –, esetleg a TRPM2-ben is a peptidlánc gerince nézhet a pórus felé.

Az egyedi csatornák különböző Na⁺ és Ca²⁺ koncentrációk melletti vezetőképessége, mindegyik pórusmutáns esetében az átengedett ionok iránti jelentős látszólagos affinitás-fokozódást mutatott (27-30. ábra). Érdekes, hogy míg a -2' vagy -3' helyre bevitt negatív töltések eltérő módon befolyásolták a csatorna inaktivációjának kinetikáját (24. B ábra), addig a csatornák permeabilitási tulajdonságait hasonló módon változtatták meg (30. ábra). A két negatív töltés hatása ebben a vonatkozásban sem volt additív, ráadásul a permeációban a -4' pozícióba inzertált leucin sem okozott további eltérést (27-30. ábra). Bár a pórusmutánsokban bekövetkezett látszólagos affinitás-növekedés sokkal kifejezettebb volt a kétértékű kationok vonatkozásában, ez egyik esetben sem társult a maximális vezetőképesség növekedésével (27-30. ábra). Erre a legkézenfekvőbb magyarázat, hogy alacsony ionkoncentrációknál a bevitt negatív töltések elektrosztatikus hatása megnöveli a pórus szájánál a lokális kation koncentrációt, így balra tolva a koncentráció-vezetőképesség összefüggést. Magas ionkoncentrációknál viszont a csatornák áteresztőképessége a limitáló tényező, amely meghatározza a vezetőképesség maximális értékét. Szemben a szűk pórusú K⁺ csatornák citoszólikus üregében lévő természetes, vagy célzottan bevitt pozitív

töltésekkel, amelyek esetében ez az elektrosztatikus hatás aszimmetrikusan, csak a kifelé irányuló áram vonatkozásában jelentkezett (188,189), a TRPM2 pórusmutások esetében az áram szimmetrikusan, mindkét irányban megnövekedett (27. ábra). Ugyanakkor, a szimmetrikus hatás nem példanélküli, hasonló eredményt kaptak a tágabb pórusú nikotinos acetilkolin receptor pórusában található centrális gyűrű töltéseinek megváltoztatásakor (190). Valószínűleg a TRPM2-nél is a nagyobb pórusméret, vagy a negatív töltések centrális elhelyezkedése eredményezheti a szimmetrikus hatást.

Mindenesetre, az októl függetlenül, az egyedi-csatornás mérésekhez kifejezetten előnyös a nagyobb vezetőképesség, hiszen így nagyobb háttérzaj is tolerálható az adatok elemzésekor.

5.4. A PIP₂ szerepe a TRPM2 csatorna működésében

A PIP₂ a legtöbb csatorna esetében az intracelluláris aktivációs kapun keresztül fejti ki hatását (191,192), így nem meglepő, hogy a TRPM2 esetében a szelektáló filterhez köthető inaktivációban nem volt szerepe (23. A ábra). Ugyanakkor, figyelembe véve, hogy a PIP₂ a TRPM család számos tagjának működését szabályozza (61,108,163-165), felmerült, hogy esetleg más módon lehet hatással a TRPM2-re. Méréseink valóban igazolták, hogy – a TRPM4/5-höz hasonlóan – a PIP₂ jelenléte befolyásolja a TRPM2 csatorna Ca²⁺ iránti látszólagos affinitását. Az általunk használt izolált membrános inside-out patch-ekben kontroll körülmények között az intracelluláris Ca²⁺ TRPM2-t aktiváló hatásának K_{1/2} értéke ~ 20 μM volt (25. D ábra). Ugyanakkor, ha magas koncentrációjú polilizin alkalmazásával teljes mértékben elfedtük a membránban található szabad PIP₂-t, a Ca²⁺-aktiváció K_{1/2} értéke > 1 mM-ra emelkedett (33. B ábra). Ezzel szemben, ha 50 μM diC₈-PIP₂ adásával biztosítottuk a membrán magas szabad PIP₂ tartalmát, a Ca²⁺ iránti látszólagos affinitás csak kismértékben nőtt meg – a becsült K_{1/2} ~ 10 μM (33. C ábra). Tekintettel arra, hogy a patch kiszakítása és a mérés megkezdése között legalább 40 másodperc telik el, és ennyi idő alatt a TRPM8 csatornával végzett méréseink tanulsága szerint (23. A ábra, felső áramgörbe) a lipid-foszfátok még Mg²⁺ hiányában is lebontják a PIP₂ túlnyomó részét, standard, Mg²⁺ jelenlétében végzett méréseink során a membrán PIP₂ tartalma nagyon alacsony kellett,

hogy legyen. Ez arra utal, hogy a TRPM2 – szemben legközelebbi rokonával, a TRPM8 csatornával – nagyon nagy affinitással köti a PIP₂-t, és így a mérés során a membránban maradó minimális PIP₂ is elegendő a közel maximális Ca²⁺ affinitás fenntartásához. Bár még további vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy mely szerkezeti elemek felelősek ezért az erős PIP₂ kötésért, számunkra egyelőre az is fontos tény, hogy a TRPM2 csatorna kapuzása megőrzi közel fiziológias jellegét külső PIP₂ forrás biztosítása nélkül is.

6. Következtetések

1, Alternatív anion keresése:

- A glutamát Cl^- helyettesítésére alkalmas anion a *Xenopus* petesejteken végzett izolált membrános patch clamp kísérletek során

2, A TRPM2 közvetlen és közvetett modulátorainak azonosítása:

- Az egészséjtes mérések alapján korábban leírt számos TRPM2 modulátor közül a H_2O_2 , és az AMP közvetlen módon nem befolyásolják a csatorna működését.
- A cADPR közvetlen módon nem hat a TRPM2 csatornára. Egészséjtes mérésekben leírt aktiváló hatását valószínűleg a minták ADPR szennyezése, esetleg közvetett módon a RYR-on keresztüli Ca^{2+} felszabadítás révén, okozhatta.
- Az NAADP a TRPM2 csatorna valódi parciális agonistája, azonban tekintettel alacsony affinitására és nM-os intracelluláris koncentrációjára e hatás fiziológiás jelentősége valószínűtlen. Az NAAD nemcsak szerkezetileg, de látszólagos affinitásában és maximális aktiváló képességében is átmenetet képez az NAADP és az ADPR között.
- A NAD^+ hatását nem tudtuk vizsgálni, mert a minta jelentős mennyiségű ADPR szennyezést tartalmazott, amit nem tudunk eltávolítani.

3, A TRPM2 irreverzibilis inaktivációjának vizsgálata:

- A csatorna irreverzibilis inaktivációját a feszültségfüggő K^+ csatornák C-típusú inaktivációjához hasonlóan a szelektáló filter konformáció változása okozhatja.
- A szelektáló filter konformációját stabilizáló mutációkkal az inaktiváció lassítható, illetve megszüntethető.
- A nem inaktiválódó T5L mutáns kapuzási kinetikai paraméterei, valamint ADPR és Ca^{2+} iránti affinitása nem változott, permeációs tulajdonságai pedig előnyösen változtak, ezért kiváló modell a TRPM2 csatorna ADPR-, illetve Ca^{2+} -függő kapuzásának egyedi-csatornás méréseken keresztül történő részletes biofizikai vizsgálatához.

4, A PIP_2 hatása a TRPM2 csatornára:

- A PIP_2 nem befolyásolja a vad típusú csatorna irreverzibilis inaktivációját. A membrán PIP_2 tartalmának $\text{diC}_8\text{-PIP}_2$ -vel történő helyreállítása nem reaktiválja a csatornákat.

- A membrán teljes szabad PIP₂ tartalmának nagy koncentrációjú polilizinnel történő lefedése, a TRPM2 Ca²⁺ iránti affinitásának drasztikus csökkenése miatt, a csatornák záródásához vezet. Ez a hatás a polilizin elvonásával, vagy DiC₈-PIP₂ alkalmazásával, visszafordítható.
- Ugyanakkor kontroll körülmények között, polilizin előzetes alkalmazása nélkül, a diC₈-PIP₂ csak kismértékben fokozza a TRPM2 Ca²⁺ iránti affinitását.
- Figyelembe véve, hogy a mérések kezdetekor a membránban fellelhető minimális PIP₂ elegendő a TRPM2 közel maximális aktivitásának fenntartásához, a csatorna feltételezhetően nagy affinitással köti a PIP₂-t.

7. Summary

TRPM2 is a non-selective cation channel, which is permeable to Na^+ , K^+ and Ca^{2+} . The channel is co-activated by intracellular Ca^{2+} and ADPR. The TRPM2 channel is abundantly expressed in brain neurons, immune cells, and pancreatic β -cells. Under physiological conditions it might play a role in glucose-induced insulin secretion and in the immune response. In addition, TRPM2 enhances the sensitivity of the cells towards oxidative stress. Thus, under pathological conditions it could be responsible for neuronal damage during ischemia/reperfusion.

Although ADPR and Ca^{2+} have been already identified as the main activators of the channel, in intact cells TRPM2 is also modulated by several additional factors. Superfusion of TRPM2-expressing cells with H_2O_2 , or intracellular dialysis of cADPR, or NAADP activates, while dialysis of AMP inhibits, TRPM2 whole-cell currents. Additionally, H_2O_2 , cADPR, and NAADP enhance ADPR-sensitivity of TRPM2 currents in intact cells. Because in whole-cell recordings the entire cellular machinery for nucleotide and Ca^{2+} -homeostasis is intact, modulators might affect TRPM2 activity either directly, by binding to TRPM2, or indirectly, by altering local ADPR and Ca^{2+} concentrations. To identify direct modulators of TRPM2, we have studied the effects of several candidates in inside-out patches excised from *Xenopus* oocytes expressing human TRPM2, by directly exposing the cytosolic faces of the patches to these compounds. H_2O_2 and enzymatically purified cADPR failed to activate, while AMP failed to inhibit TRPM2 currents. NAADP and NAAD were partial agonists, but both with very low affinities. Neither of H_2O_2 , cADPR, and NAADP enhanced activation by ADPR. Considering intracellular concentrations of these compounds, none of them are likely to directly affect the TRPM2 channel protein in a physiological context.

Although our macroscopic measurements have identified the main modulators of the channel, little is known about the mechanism of gating. Steady-state single-channel analysis could be very useful for addressing such details, however wild-type TRPM2 channels are not amenable to such studies, because they irreversibly inactivate shortly after patch excision. This inactivation can be completely prevented by mutations in the extracellular selectivity filter. Introduction of two negative charges plus a single-residue insertion, to mimic the filter sequence of TRPM5, results in TRPM2 channels with changed permeation properties but intact ADPR/ Ca^{2+} -dependent gating, which retain unabated maximal activity for over 1 hour. This non-inactivating TRPM2 variant will be an invaluable tool for gating studies.

8. Összefoglalás

A TRPM2 nem-szelektív kation csatorna, amely egyaránt permeábilis Na⁺-ra, K⁺-ra és Ca²⁺-ra. A csatornát intracelluláris Ca²⁺ és ADPR együttes jelenléte aktiválja. A TRPM2 legnagyobb mennyiségben az agyban, immunsejtekben és a hasnyálmirigy β -sejtjeiben fejeződik ki. Fiziológias körülmények között szerepe lehet az inzulin szekréció, illetve az immunválasz szabályozásában. Emellett a TRPM2 csatorna fokozza a sejtek érzékenységét az oxidatív stresszre, így patológias körülmények között hozzájárulhat az ideg- és szívműködés iszkémiát követő reperfüziós károsodásához.

Bár a csatorna fő aktivátorait, az ADPR-t és a Ca²⁺-ot, már azonosították, számos egyéb anyagnak is szerepe lehet a TRPM2 szabályozásában. Egészsejtes mérések a H₂O₂-ot, a cADPR-t és az NAADP-t lehetséges aktivátorként, míg az AMP-t lehetséges gátlószerként azonosították. Emellett a H₂O₂, a cADPR és az NAADP már alacsony koncentrációban fokozták a TRPM2 áram ADPR iránti érzékenységét. Mivel az egészsejtes mérések során a sejt nukleotid és Ca²⁺ homeosztázisáért felelős rendszerek jelen vannak, ezért nem dönthető el egyértelműen, hogy a fenti modulátorok a TRPM2 csatornához kötődve közvetlenül, vagy a fő aktivátorok (ADPR-t és Ca²⁺) lokális koncentrációinak megváltoztatásával, közvetett módon hatnak-e. A közvetlen modulátorok azonosítása céljából e molekulák hatását a humán TRPM2 csatornát kifejező *Xenopus* petesejtekből izolált inside-out patch-ekben vizsgáltuk meg. Ilyen körülmények között a H₂O₂ és az enzimatisztított cADPR nem aktiválta, míg az AMP nem gátolta a TRPM2 csatornát. Bár az NAADP és az NAAD kis affinitású parciális agonistának bizonyultak, alacsony intracelluláris koncentrációjuk miatt e közvetlen hatásnak valószínűleg nincs fiziológias jelentősége.

Bár makroszkópos méréseinkben azonosítottuk a csatorna aktivátorait, a kapuzás mechanizmusáról csak nagyon keveset tudunk. Steady-state egyedi-csatornás mérések elemzése sokat segíthetne e részletek tisztázásában, de a vad típusú TRPM2 nem alkalmas ilyen vizsgálatokra, mert a csatornák a patch kiszakítása után hamar inaktiválódnak. Ez az inaktiváció megszüntethető két negatív töltés és egy extra aminosav bevitelével, amelyek révén a TRPM2 szelektáló filtere "TRPM5-szerűvé" válik. Bár a mutáns csatorna permeabilitási tulajdonságai megváltoznak, ADPR/Ca²⁺-függő kapuzása változatlan marad, így ez a nem-inaktiválódó TRPM2 variáns kiváló eszköz lehet e kapuzási mechanizmus részletes biofizikai vizsgálatához.

9. Irodalomjegyzék

- (1) Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**(1): 11-21.
- (2) Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature*, **395**(6703): 645-648.
- (3) Clapham DE. (2007) Calcium signaling. *Cell*, **131**(6): 1047-1058.
- (4) Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(7): 517-529.
- (5) Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. (2002) Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol*, **12**(16): R563-R565.
- (6) Berridge M, Lipp P, Bootman M. (1999) Calcium signalling. *Curr Biol*, **9**(5): R157-R159.
- (7) Gerasimenko J, Maruyama Y, Tepikin A, Petersen OH, Gerasimenko O. (2003) Calcium signalling in and around the nuclear envelope. *Biochem Soc Trans*, **31**(Pt 1): 76-78.
- (8) Gerasimenko JV, Maruyama Y, Yano K, Dolman NJ, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. (2003) NAADP mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol*, **163**(2): 271-282.
- (9) Morgan AJ, Platt FM, Lloyd-Evans E, Galione A. (2011) Molecular mechanisms of endolysosomal Ca²⁺ signalling in health and disease. *Biochem J*, **439**(3): 349-374.
- (10) Berger F, Ramirez-Hernandez MH, Ziegler M. (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci*, **29**(3): 111-118.
- (11) Ziegler M. (2000) New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem*, **267**(6): 1550-1564.
- (12) Lee HC. (2011) Cyclic ADP-ribose and NAADP: fraternal twin messengers for calcium signaling. *Sci China Life Sci*, **54**(8): 699-711.
- (13) Fliegert R, Gasser A, Guse AH. (2007) Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans*, **35**(Pt 1): 109-114.
- (14) Cancela JM, Charpentier G, Petersen OH. (2003) Co-ordination of Ca(2+) signalling in mammalian cells by the new Ca(2+)-releasing messenger NAADP. *Pflugers Arch*, **446**(3): 322-327.

- (15) Lee HC. (2001) Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**: 317-345.
- (16) Ceni C, Muller-Steffner H, Lund F, Pochon N, Schweitzer A, De WM, Schuber F, Villaz M, Moutin MJ. (2003) Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/NAD⁺-glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J Biol Chem*, **278**(42): 40670-40678.
- (17) Bacher I, Zidar A, Kratzel M, Hohenegger M. (2004) Channelling of substrate promiscuity of the skeletal-muscle ADP-ribosyl cyclase isoform. *Biochem J*, **381**(Pt 1): 147-154.
- (18) Liang M, Chini EN, Cheng J, Dousa TP. (1999) Synthesis of NAADP and cADPR in mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **371**(2): 317-325.
- (19) Sternfeld L, Krause E, Guse AH, Schulz I. (2003) Hormonal control of ADP-ribosyl cyclase activity in pancreatic acinar cells from rats. *J Biol Chem*, **278**(36): 33629-33636.
- (20) Aarhus R, Graeff RM, Dickey DM, Walseth TF, Lee HC. (1995) ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem*, **270**(51): 30327-30333.
- (21) Lee HC. (2000) NAADP: An emerging calcium signaling molecule. *J Membr Biol*, **173**(1): 1-8.
- (22) Graeff R, Liu Q, Kriksunov IA, Hao Q, Lee HC. (2006) Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J Biol Chem*, **281**(39): 28951-28957.
- (23) Clapper DL, Walseth TF, Dargie PJ, Lee HC. (1987) Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem*, **262**(20): 9561-9568.
- (24) Lee HC, Walseth TF, Bratt GT, Hayes RN, Clapper DL. (1989) Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. *J Biol Chem*, **264**(3): 1608-1615.
- (25) Jorgensen AO, Shen AC, Campbell KP. (1985) Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells. *J Cell Biol*, **101**(1): 257-268.
- (26) Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, Ehrlich BE, Nathanson MH. (2003) Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(5): 2975-2980.
- (27) Patel S, Marchant JS, Brailoiu E. (2010) Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals. *Cell Calcium*, **47**(6): 480-490.

- (28) Sumoza-Toledo A, Lange I, Cortado H, Bhagat H, Mori Y, Fleig A, Penner R, Partida-Sanchez S. (2011) Dendritic cell maturation and chemotaxis is regulated by TRPM2-mediated lysosomal Ca²⁺ release. *FASEB J*, **25**(10): 3529-3542.
- (29) Nicholls DG. (2005) Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*, **38**(3-4): 311-317.
- (30) Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, **567**(1): 96-102.
- (31) Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS. (2001) Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*, **276**(24): 21482-21488.
- (32) Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. (2003) Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res*, **36**(2): 183-190.
- (33) Ozawa T. (2010) Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels (Review). *Mol Med Report*, **3**(2): 199-204.
- (34) Hosoi E, Nishizaki C, Gallagher KL, Wyre HW, Matsuo Y, Sei Y. (2001) Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J Immunol*, **167**(9): 4887-4894.
- (35) Mandi M, Toth B, Timar G, Bak J. (2006) Ca²⁺ release triggered by NAADP in hepatocyte microsomes. *Biochem J*, **395**(2): 233-238.
- (36) Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, Sukhomlin TK, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. (2006) Bile acids induce Ca²⁺ release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. *J Biol Chem*, **281**(52): 40154-40163.
- (37) Khoo KM, Han MK, Park JB, Chae SW, Kim UH, Lee HC, Bay BH, Chang CF. (2000) Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in hepatocyte nucleus. *J Biol Chem*, **275**(32): 24807-24817.
- (38) Roderick HL, Berridge MJ, Bootman MD. (2003) Calcium-induced calcium release. *Curr Biol*, **13**(11): R425.
- (39) Meszaros LG, Bak J, Chu A. (1993) Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Nature*, **364**(6432): 76-79.
- (40) Noguchi N, Takasawa S, Nata K, Tohgo A, Kato I, Ikehata F, Yonekura H, Okamoto H. (1997) Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca²⁺ from islet microsomes. *J Biol Chem*, **272**(6): 3133-3136.

- (41) Guse AH. (2004) Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Med Chem*, **11**(7): 847-855.
- (42) Guse AH. (2005) Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *FEBS J*, **272**(18): 4590-4597.
- (43) Bak J, White P, Timar G, Missiaen L, Genazzani AA, Galione A. (1999) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca²⁺ release from brain microsomes. *Curr Biol*, **9**(14): 751-754.
- (44) Bak J, Billington RA, Timar G, Dutton AC, Genazzani AA. (2001) NAADP receptors are present and functional in the heart. *Curr Biol*, **11**(12): 987-990.
- (45) Patel S, Churchill GC, Galione A. (2001) Coordination of Ca²⁺ signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci*, **26**(8): 482-489.
- (46) Brailoiu E, Churamani D, Cai X, Schrlau MG, Brailoiu GC, Gao X, Hooper R, Boulware MJ, Dun NJ, Marchant JS, Patel S. (2009) Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J Cell Biol*, **186**(2): 201-209.
- (47) Zong X, Schieder M, Cuny H, Fenske S, Gruner C, Rotzer K, Griesbeck O, Harz H, Biel M, Wahl-Schott C. (2009) The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca²⁺-release from lysosomal stores. *Pflugers Arch*, **458**(5): 891-899.
- (48) Calcraft PJ, Ruas M, Pan Z, Cheng X, Arredouani A, Hao X, Tang J, Rietdorf K, Teboul L, Chuang KT, Lin P, Xiao R, Wang C, Zhu Y, Lin Y, Wyatt CN, Parrington J, Ma J, Evans AM, Galione A, Zhu MX. (2009) NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, **459**(7246): 596-600.
- (49) Magnone M, Bauer I, Poggi A, Mannino E, Sturla L, Brini M, Zocchi E, De FA, Nencioni A, Bruzzone S. (2012) NAD⁺ levels control Ca²⁺ store replenishment and mitogen-induced increase of cytosolic Ca²⁺ by Cyclic ADP-ribose-dependent TRPM2 channel gating in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, **287**(25): 21067-21081.
- (50) McHugh D, Flemming R, Xu SZ, Perraud AL, Beech DJ. (2003) Critical intracellular Ca²⁺ dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J Biol Chem*, **278**(13): 11002-11006.
- (51) Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y. (2008) TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*, **14**(7): 738-747.

- (52) Csanady L, Torocsik 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**(2): 189-203.
- (53) Clapham DE. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*, **426**(6966): 517-524.
- (54) Nilius B, Owsianik G. (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, **12**(3): 218.
- (55) Montell C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, **2001**(90): RE1.
- (56) Venkatachalam K, Montell C. (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem*, **76**: 387-417.
- (57) Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, **68**: 619-647.
- (58) Schnitzler M, Waring J, Gudermann T, Chubanov V. (2008) Evolutionary determinants of divergent calcium selectivity of TRPM channels. *FASEB J*, **22**(5): 1540-1551.
- (59) Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol*, **68**: 685-717.
- (60) Fujiwara Y, Minor DL, Jr. (2008) X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J Mol Biol*, **383**(4): 854-870.
- (61) Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE. (2005) PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci*, **8**(5): 626-634.
- (62) Damann N, Voets T, Nilius B. (2008) TRPs in our senses. *Curr Biol*, **18**(18): R880-R889.
- (63) Nilius B, Owsianik G. (2010) Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch*, **460**(2): 437-450.
- (64) Maruyama Y, Ogura T, Mio K, Kiyonaka S, Kato K, Mori Y, Sato C. (2007) Three-dimensional reconstruction using transmission electron microscopy reveals a swollen, bell-shaped structure of transient receptor potential melastatin type 2 cation channel. *J Biol Chem*, **282**(51): 36961-36970.
- (65) Perraud AL, Schmitz C, Scharenberg AM. (2003) TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium*, **33**(5-6): 519-531.

- (66) Mei ZZ, Jiang LH. (2009) Requirement for the N-terminal coiled-coil domain for expression and function, but not subunit interaction of, the ADPR-activated TRPM2 channel. *J Membr Biol*, **230**(2): 93-99.
- (67) Kuhn FJ, Kuhn C, Naziroglu M, Luckhoff A. (2009) Role of an N-terminal splice segment in the activation of the cation channel TRPM2 by ADP-ribose and hydrogen peroxide. *Neurochem Res*, **34**(2): 227-233.
- (68) Starkus J, Beck A, Fleig A, Penner R. (2007) Regulation of TRPM2 by extra- and intracellular calcium. *J Gen Physiol*, **130**(4): 427-440.
- (69) Tong Q, Zhang W, Conrad K, Mostoller K, Cheung JY, Peterson BZ, Miller BA. (2006) Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca²⁺ sensor calmodulin. *J Biol Chem*, **281**(14): 9076-9085.
- (70) Du J, Xie J, Yue L. (2009) Intracellular calcium activates TRPM2 and its alternative spliced isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(17): 7239-7244.
- (71) Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**(5360): 69-77.
- (72) Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*, **309**(5736): 897-903.
- (73) Kuhn FJ, Witschas K, Kuhn C, Luckhoff A. (2010) Contribution of the S5-pore-S6 domain to the gating characteristics of the cation channels TRPM2 and TRPM8. *J Biol Chem*, **285**(35): 26806-26814.
- (74) Mei ZZ, Mao HJ, Jiang LH. (2006) Conserved cysteine residues in the pore region are obligatory for human TRPM2 channel function. *Am J Physiol Cell Physiol*, **291**(5): C1022-C1028.
- (75) Kuhn FJ, Knop G, Luckhoff A. (2007) The transmembrane segment S6 determines cation versus anion selectivity of TRPM2 and TRPM8. *J Biol Chem*, **282**(38): 27598-27609.
- (76) Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, **411**(6837): 595-599.
- (77) Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, Furuichi K. (2001) Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science*, **293**(5533): 1327-1330.
- (78) Lepage PK, Boulay G. (2007) Molecular determinants of TRP channel assembly. *Biochem Soc Trans*, **35**(Pt 1): 81-83.

- (79) Rohacs T, Nilius B. (2007) Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch*, **455**(1): 157-168.
- (80) Jiang LH. (2007) Subunit interaction in channel assembly and functional regulation of transient receptor potential melastatin (TRPM) channels. *Biochem Soc Trans*, **35**(Pt 1): 86-88.
- (81) Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci*, **24**(23): 5307-5314.
- (82) Schwake M, Athanasiadu D, Beimgraben C, Blanz J, Beck C, Jentsch TJ, Saftig P, Friedrich T. (2006) Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly. *J Neurosci*, **26**(14): 3757-3766.
- (83) Jenke M, Sanchez A, Monje F, Stuhmer W, Weseloh RM, Pardo LA. (2003) C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J*, **22**(3): 395-403.
- (84) Erler I, Al-Ansary DM, Wissenbach U, Wagner TF, Flockerzi V, Niemeyer BA. (2006) Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J Biol Chem*, **281**(50): 38396-38404.
- (85) Xu XZ, Moebius F, Gill DL, Montell C. (2001) Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(19): 10692-10697.
- (86) Mei ZZ, Xia R, Beech DJ, Jiang LH. (2006) Intracellular coiled-coil domain engaged in subunit interaction and assembly of melastatin-related transient receptor potential channel 2. *J Biol Chem*, **281**(50): 38748-38756.
- (87) Tsuruda PR, Julius D, Minor DL, Jr. (2006) Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron*, **51**(2): 201-212.
- (88) Bessman MJ, Frick DN, O'Handley SF. (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem*, **271**(41): 25059-25062.
- (89) Gabelli SB, Bianchet MA, Ohnishi Y, Ichikawa Y, Bessman MJ, Amzel LM. (2002) Mechanism of the Escherichia coli ADP-ribose pyrophosphatase, a Nudix hydrolase. *Biochemistry*, **41**(30): 9279-9285.
- (90) Zha M, Guo Q, Zhang Y, Yu B, Ou Y, Zhong C, Ding J. (2008) Molecular mechanism of ADP-ribose hydrolysis by human NUDT5 from structural and kinetic studies. *J Mol Biol*, **379**(3): 568-578.
- (91) Huang N, Sorci L, Zhang X, Brautigam CA, Li X, Raffaelli N, Magni G, Grishin NV, Osterman AL, Zhang H. (2008) Bifunctional NMN

adenylyltransferase/ADP-ribose pyrophosphatase: structure and function in bacterial NAD metabolism. *Structure*, **16**(2): 196-209.

- (92) Shen BW, Perraud AL, Scharenberg A, Stoddard BL. (2003) The crystal structure and mutational analysis of human NUDT9. *J Mol Biol*, **332**(2): 385-398.
- (93) Perraud AL, Shen B, Dunn CA, Rippe K, Smith MK, Bessman MJ, Stoddard BL, Scharenberg AM. (2003) NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem*, **278**(3): 1794-1801.
- (94) Carloto A, Costas MJ, Cameselle JC, McLennan AG, Ribeiro JM. (2006) The specific, submicromolar-Km ADP-ribose pyrophosphatase purified from human placenta is enzymically indistinguishable from recombinant NUDT9 protein, including a selectivity for Mn²⁺ as activating cation and increase in Km for ADP-ribose, both elicited by H₂O₂. *Biochim Biophys Acta*, **1760**(10): 1545-1551.
- (95) Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM. (2005) Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem*, **280**(7): 6138-6148.
- (96) Kuhn FJ, Luckhoff A. (2004) Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem*, **279**(45): 46431-46437.
- (97) Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. (2002) Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*, **277**(26): 23150-23156.
- (98) Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. (2002) LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, **9**(1): 163-173.
- (99) Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, Kitada C, Matsushime H, Furuichi K. (2003) Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol*, **191**(3): 201-207.
- (100) Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C. (2004) Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**(1): C129-C137.

- (101) Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. (2005) Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*, **18**(1): 61-69.
- (102) Beck A, Kolisek M, Bagley LA, Fleig A, Penner R. (2006) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes. *FASEB J*, **20**(7): 962-964.
- (103) Grubisha O, Rafty LA, Takanishi CL, Xu X, Tong L, Perraud AL, Scharenberg AM, Denu JM. (2006) Metabolite of SIR2 reaction modulates TRPM2 ion channel. *J Biol Chem*.
- (104) Lange I, Penner R, Fleig A, Beck A. (2008) Synergistic regulation of endogenous TRPM2 channels by adenine dinucleotides in primary human neutrophils. *Cell Calcium*, **44**(6): 604-615.
- (105) Heiner I, Eisfeld J, Warnstedt M, Radukina N, Jungling E, Luckhoff A. (2006) Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem J*, **398**(2): 225-232.
- (106) Gwanyanya A, Sipido KR, Vereecke J, Mubagwa K. (2006) ATP and PIP2 dependence of the magnesium-inhibited, TRPM7-like cation channel in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **291**(4): C627-C635.
- (107) Zhang Z, Okawa H, Wang Y, Liman ER. (2005) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate rescues TRPM4 channels from desensitization. *J Biol Chem*, **280**(47): 39185-39192.
- (108) Liu D, Liman ER. (2003) Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(25): 15160-15165.
- (109) Kaneko S, Kawakami S, Hara Y, Wakamori M, Itoh E, Minami T, Takada Y, Kume T, Katsuki H, Mori Y, Akaike A. (2006) A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci*, **101**(1): 66-76.
- (110) Ishii M, Shimizu S, Hara Y, Hagiwara T, Miyazaki A, Mori Y, Kiuchi Y. (2006) Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F. *Cell Calcium*, **39**(6): 487-494.
- (111) Zhang W, Tong Q, Conrad K, Wozney J, Cheung JY, Miller BA. (2007) Regulation of TRP channel TRPM2 by the tyrosine phosphatase PTPL1. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**(5): C1746-C1758.
- (112) Buelow B, Song Y, Scharenberg AM. (2008) The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes. *J Biol Chem*, **283**(36): 24571-24583.

- (113) Naziroglu M, Luckhoff A. (2008) A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res*, **33**(7): 1256-1262.
- (114) Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q, Conrad K, Sun SC, Penn L, Barber DL, Stahl R, Carey DJ, Cheung JY, Miller BA. (2006) TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**(4): C1146-C1159.
- (115) Yang KT, Chang WL, Yang PC, Chien CL, Lai MS, Su MJ, Wu ML. (2006) Activation of the transient receptor potential M2 channel and poly(ADP-ribose) polymerase is involved in oxidative stress-induced cardiomyocyte death. *Cell Death Differ*, **13**(10): 1815-1826.
- (116) Fonfria E, Marshall IC, Benham CD, Boyfield I, Brown JD, Hill K, Hughes JP, Skaper SD, McNulty S. (2004) TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol*, **143**(1): 186-192.
- (117) Blenn C, Wyrsh P, Bader J, Bollhalder M, Althaus FR. (2011) Poly(ADP-ribose)glycohydrolase is an upstream regulator of Ca²⁺ fluxes in oxidative cell death. *Cell Mol Life Sci*, **68**(8): 1455-1466.
- (118) Smith MA, Herson PS, Lee K, Pinnock RD, Ashford ML. (2003) Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones involves activation of a non-selective cation channel. *J Physiol*, **547**(Pt 2): 417-425.
- (119) Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M. (2006) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J*, **25**(9): 1804-1815.
- (120) Guse AH. (1999) Cyclic ADP-ribose: a novel Ca²⁺-mobilising second messenger. *Cell Signal*, **11**(5): 309-316.
- (121) Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV, Mayr GW. (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*, **398**(6722): 70-73.
- (122) Jackson MD, Denu JM. (2002) Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta -NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *J Biol Chem*, **277**(21): 18535-18544.
- (123) Nilius B, Prenen J, Voets T, Droogmans G. (2004) Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4b. *Pflugers Arch*, **448**(1): 70-75.
- (124) Du J, Xie J, Yue L. (2009) Modulation of TRPM2 by acidic pH and the underlying mechanisms for pH sensitivity. *J Gen Physiol*, **134**(6): 471-488.

- (125) Yang W, Zou J, Xia R, Vaal ML, Seymour VA, Luo J, Beech DJ, Jiang LH. (2010) State-dependent inhibition of TRPM2 channel by acidic pH. *J Biol Chem*, **285**(40): 30411-30418.
- (126) Starkus JG, Fleig A, Penner R. (2010) The calcium-permeable non-selective cation channel TRPM2 is modulated by cellular acidification. *J Physiol*, **588**(Pt 8): 1227-1240.
- (127) Zou J, Yang W, Beech DJ, Jiang LH. (2011) A residue in the TRPM2 channel outer pore is crucial in determining species-dependent sensitivity to extracellular acidic pH. *Pflugers Arch*, **462**(2): 293-302.
- (128) Csanady L. (2010) Permeating proton found guilty in compromising TRPM2 channel activity. *J Physiol*, **588**(Pt 10): 1661-1662.
- (129) Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. (1998) Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics*, **54**(1): 124-131.
- (130) Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K, Miller BA. (2003) A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem*, **278**(18): 16222-16229.
- (131) Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. (2008) Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res*, **102**(3): 347-355.
- (132) Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, Mori Y, Tymianski M, Macdonald JF. (2009) Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J Physiol*, **587**(Pt 5): 965-979.
- (133) Chung KK, Freestone PS, Lipski J. (2011) Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol*, **106**(6): 2865-2875.
- (134) Heiner I, Einfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. (2003) Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J*, **371**(Pt 3): 1045-1053.
- (135) Wehrhahn J, Kraft R, Harteneck C, Hauschildt S. (2010) Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *J Immunol*, **184**(5): 2386-2393.
- (136) Uemura T, Kudoh J, Noda S, Kanba S, Shimizu N. (2005) Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**(4): 1232-1243.

- (137) Hill K, Tigue NJ, Kelsell RE, Benham CD, McNulty S, Schaefer M, Randall AD. (2006) Characterisation of recombinant rat TRPM2 and a TRPM2-like conductance in cultured rat striatal neurones. *Neuropharmacology*, **50**(1): 89-97.
- (138) Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, Mori Y, Fleig A, Penner R. (2009) TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells. *Sci Signal*, **2**(71): ra23.
- (139) Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M. (2011) Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes*, **60**(1): 119-126.
- (140) Zhang Z, Zhang W, Jung DY, Ko HJ, Lee Y, Friedline R, Lee E, Jun J, Ma Z, Kim F, Tsitsilianos N, Chapman K, Morrison A, Cooper MP, Miller BA, Kim JK. (2012) TRPM2 Ca²⁺-Channel Regulates Energy Balance and Glucose Metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- (141) Knowles H, Heizer JW, Li Y, Chapman K, Ogden CA, Andreasen K, Shapland E, Kucera G, Mogan J, Humann J, Lenz LL, Morrison AD, Perraud AL. (2011) Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) ion channel is required for innate immunity against *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(28): 11578-11583.
- (142) Di A, Gao XP, Qian F, Kawamura T, Han J, Hecquet C, Ye RD, Vogel SM, Malik AB. (2012) The redox-sensitive cation channel TRPM2 modulates phagocyte ROS production and inflammation. *Nat Immunol*, **13**(1): 29-34.
- (143) Hecquet CM, Malik AB. (2009) Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost*, **101**(4): 619-625.
- (144) Sun L, Yau HY, Wong WY, Li RA, Huang Y, Yao X. (2012) Role of TRPM2 in H₂O₂-Induced Cell Apoptosis in Endothelial Cells. *PLoS One*, **7**(8): e43186.
- (145) Fonfria E, Marshall IC, Boyfield I, Skaper SD, Hughes JP, Owen DE, Zhang W, Miller BA, Benham CD, McNulty S. (2005) Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem*, **95**(3): 715-723.
- (146) Hermosura MC, Cui AM, Go RC, Davenport B, Shetler CM, Heizer JW, Schmitz C, Mocz G, Garruto RM, Perraud AL. (2008) Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(46): 18029-18034.
- (147) McQuillin A, Bass NJ, Kalsi G, Lawrence J, Puri V, Choudhury K, Detera-Wadleigh SD, Curtis D, Gurling HM. (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**(2): 134-142.

- (148) Yamamoto S, Shimizu S, Mori Y. (2009) Involvement of TRPM2 channel in amplification of reactive oxygen species-induced signaling and chronic inflammation. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, **134**(3): 122-126.
- (149) Jia J, Verma S, Nakayama S, Quillinan N, Grafe MR, Hurn PD, Herson PS. (2011) Sex differences in neuroprotection provided by inhibition of TRPM2 channels following experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, **31**(11): 2160-2168.
- (150) Sakmann B, Neher E. (1995) Single channel recording. **Second Edition**. New York, Plenum Press, 341-354, 499-503.
- (151) Qu Z, Hartzell HC. (2000) Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels. *J Gen Physiol*, **116**(6): 825-844.
- (152) Sigworth FJ, Sine SM. (1987) Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J*, **52**(6): 1047-1054.
- (153) Csanady L. (2000) Rapid kinetic analysis of multichannel records by a simultaneous fit to all dwell-time histograms. *Biophys J*, **78**(2): 785-799.
- (154) Higashida H, Yokoyama S, Hashii M, Taketo M, Higashida M, Takayasu T, Ohshima T, Takasawa S, Okamoto H, Noda M. (1997) Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J Biol Chem*, **272**(50): 31272-31277.
- (155) Higashida H, Egorova A, Higashida C, Zhong ZG, Yokoyama S, Noda M, Zhang JS. (1999) Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **274**(47): 33348-33354.
- (156) Ercan-Fang N, Nuttall FQ. (1997) The effect of caffeine and caffeine analogs on rat liver phosphorylase a activity. *J Pharmacol Exp Ther*, **280**(3): 1312-1318.
- (157) Brailoiu GC, Brailoiu E, Parkesh R, Galione A, Churchill GC, Patel S, Dun NJ. (2009) NAADP-mediated channel 'chatter' in neurons of the rat medulla oblongata. *Biochem J*, **419**(1): 91-7, 2.
- (158) Hwang TC, Nagel G, Nairn AC, Gadsby DC. (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**(11): 4698-4702.
- (159) Xu JJ, Hao LY, Kameyama A, Kameyama M. (2004) Calmodulin reverses rundown of L-type Ca(2+) channels in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**(6): C1717-C1724.
- (160) Zhang G, Xu R, Heinemann SH, Hoshi T. (2006) Cysteine oxidation and rundown of large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun*, **342**(4): 1389-1395.

- (161) Nilius B, Owsianik G, Voets T. (2008) Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. *EMBO J*, **27**(21): 2809-2816.
- (162) Rohacs T, Lopes C, Mirshahi T, Jin T, Zhang H, Logothetis DE. (2002) Assaying phosphatidylinositol bisphosphate regulation of potassium channels. *Methods Enzymol*, **345**: 71-92.
- (163) Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Vennekens R, Voets T. (2006) The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J*, **25**(3): 467-478.
- (164) Runnels LW, Yue L, Clapham DE. (2002) The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol*, **4**(5): 329-336.
- (165) Liu B, Qin F. (2005) Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci*, **25**(7): 1674-1681.
- (166) Nilius B, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Wang C, Zhu MX, Voets T. (2005) The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J Biol Chem*, **280**(24): 22899-22906.
- (167) Ahern CA, Eastwood AL, Dougherty DA, Horn R. (2009) An electrostatic interaction between TEA and an introduced pore aromatic drives spring-in-the-door inactivation in Shaker potassium channels. *J Gen Physiol*, **134**(6): 461-469.
- (168) Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, **414**(6859): 43-48.
- (169) Nilius B, Prenen J, Owsianik G. (2011) Irritating channels: the case of TRPA1. *J Physiol*, **589**(Pt 7): 1543-1549.
- (170) Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B. (2004) Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *J Biol Chem*, **279**(15): 15223-15230.
- (171) Suh BC, Hille B. (2007) Electrostatic interaction of internal Mg²⁺ with membrane PIP₂ Seen with KCNQ K⁺ channels. *J Gen Physiol*, **130**(3): 241-256.
- (172) Naziroglu M, Ozgul C, Cig B, Dogan S, Uguz AC. (2011) Glutathione modulates Ca(2+) influx and oxidative toxicity through TRPM2 channel in rat dorsal root ganglion neurons. *J Membr Biol*, **242**(3): 109-118.
- (173) Naziroglu M. (2007) New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res*, **32**(11): 1990-2001.
- (174) Naziroglu M. (2011) TRPM2 channel membrane currents in primary rat megakaryocytes were activated by the agonist ADP-ribose but not oxidative stress. *J Membr Biol*, **241**(2): 51-57.

- (175) Yarishkin OV, Hwang EM, Park JY, Kang D, Han J, Hong SG. (2008) Endogenous TRPM4-like channel in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **369**(2): 712-717.
- (176) 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**(1): 313-327.
- (177) Takahashi K, Kukimoto I, Tokita K, Inageda K, Inoue S, Kontani K, Hoshino S, Nishina H, Kanaho Y, Katada T. (1995) Accumulation of cyclic ADP-ribose measured by a specific radioimmunoassay in differentiated human leukemic HL-60 cells with all-trans-retinoic acid. *FEBS Lett*, **371**(2): 204-208.
- (178) Churamani D, Carrey EA, Dickinson GD, Patel S. (2004) Determination of cellular nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) levels. *Biochem J*, **380**(Pt 2): 449-454.
- (179) Gasser A, Bruhn S, Guse AH. (2006) Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J Biol Chem*, **281**(25): 16906-16913.
- (180) Bak J, Billington RA, Genazzani AA. (2002) Effect of luminal and extravesicular Ca²⁺ on NAADP binding and release properties. *Biochem Biophys Res Commun*, **295**(4): 806-811.
- (181) Mandi M, Bak J. (2008) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) and Ca²⁺ mobilization. *J Recept Signal Transduct Res*, **28**(3): 163-184.
- (182) Brailoiu E, Hooper R, Cai X, Brailoiu GC, Keebler MV, Dun NJ, Marchant JS, Patel S. (2010) An ancestral deuterostome family of two-pore channels mediates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-dependent calcium release from acidic organelles. *J Biol Chem*, **285**(5): 2897-2901.
- (183) Billington RA, Genazzani AA. (2000) Characterization of NAADP(+) binding in sea urchin eggs. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**(1): 112-116.
- (184) Ogielska EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. (1995) Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels. *Biophys J*, **69**(6): 2449-2457.
- (185) Panyi G, Sheng Z, Deutsch C. (1995) C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J*, **69**(3): 896-903.
- (186) Baukrowitz T, Yellen G. (1995) Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*, **15**(4): 951-960.
- (187) Sauer DB, Zeng W, Raghunathan S, Jiang Y. (2011) Protein interactions central to stabilizing the K⁺ channel selectivity filter in a four-sited configuration for selective K⁺ permeation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(40): 16634-16639.

- (188) Nimigean CM, Chappie JS, Miller C. (2003) Electrostatic tuning of ion conductance in potassium channels. *Biochemistry*, **42**(31): 9263-9268.
- (189) Brelidze TI, Niu X, Magleby KL. (2003) A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(15): 9017-9022.
- (190) Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, Numa S. (1988) Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*, **335**(6191): 645-648.
- (191) Whorton MR, MacKinnon R. (2011) Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G proteins, PIP₂, and sodium. *Cell*, **147**(1): 199-208.
- (192) Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. (2011) Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*, **477**(7365): 495-498.

10. Saját publikációk jegyzéke

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

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**: 30091-30102.

IF: 5,328

Tóth B, Csanády L. (2012) Pore collapse underlies irreversible inactivation of TRPM2 cation channel currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 13440-13445.

IF: 9,681*

Egyéb közlemények:

Mándi M, **Tóth B**, Timar G, Bak J. (2006) Ca²⁺ release triggered by NAADP in hepatocyte microsomes. *Biochem J*, **395**: 233-238.

IF: 4,100

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Csanády Lászlónak, hogy doktorandusz éveim alatt bevezetett az ioncsatornák magával ragadó világába. Hálás vagyok iránymutatásaiért, tanácsaiért és végtelen türelméért, aminek határát minden próbálkozásom ellenére sem sikerült átlépnem.

Köszönöm Bak Juditnak, hogy tudományos diákköri témavezetőmként megismertetett a tudományos kutatás alapjaival, és hogy szakmai és személyes támogatására, barátságára mindig számíthattam.

Köszönöm Töröcsik Beátának és Szöllősi Andrásnak a kísérletekhez nyújtott segítségüket,

Köszönöm Mayer Dorottyának, hogy a petesejtek preparálásával és injektálásával szintén hozzájárult eredményeimhez.

Ez úton is szeretném megköszönni Prof. Ádám Veronikának, az Orvosi Biokémiai Intézet igazgatójának, hogy már tudományos diákkörösként is az intézetében kutathattam, és hogy PhD hallgatóként az Ioncsatorna munkacsoportba irányított.

Szeretnék köszönetet mondani Rohács Tibornak a TRPM8 klónért, valamint a PIP₂ vizsgálatához nyújtott felbecsülhetetlen értékű tanácsaiért.

Természetesen köszönöm Bauer Pálnak, Tretter Lászlónak, Christos Chinopoulosnak és a Neurobiokémiai Munkacsoport többi tagjának a rengeteg segítséget, amit az elmúlt közel tíz év során nyújtottak.

Hálás vagyok szüleimnek szeretetükért és támogatásukért, amiért mindent megtettek, hogy időmet a mindennapi problémák helyett a hobbimmal tölthessem.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet barátaimnak a közösen eltöltött szabadidőért.