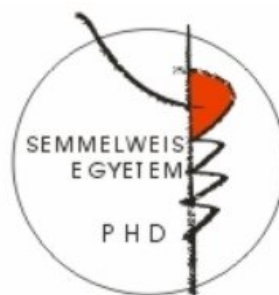


A TRPM2 csatorna szerkezet-funkció vizsgálata

Doktori tézisek

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

Bevezetés

A Transziens Receptor Potenciál Melastatin 2 (TRPM2), a TRP csatornák szerteágazó családjába tartozó Ca^{2+} permeábilis nem-szelektív kation csatorna. Legnagyobb mennyiségben idegsejtekben, csontvelőben, fagocitákban, hasnyálmirigy inzulint szekretáló β -sejtjeiben és szívizomsejtekben fejeződik ki, ahol oxidatív stressz hatására aktiválódik. TRPM2 jelenléte szükséges a fagocita sejtek patogén hatására bekövetkező migrációjához és citokin termeléséhez, illetve a hasnyálmirigy β -sejtek normális glükóz-indukált inzulin szekréciójához. Emellett a TRPM2-nek számos, a sejtek apoptózisához vezető, patológiás folyamatban is szerepe lehet, beleértve a stroke-ot, myocardialis infarktust és egyes krónikus neurodegeneratív betegségeket.

A TRP család közös jellemzője, hogy tagjai tetramer szerkezetű kation csatornák, amelyek alegységei 6 transzmembrán (TM) szakaszt tartalmaznak. Ezek közül az 5. és a 6. TM szegmens határolja a pórust. Az N- és C-terminális részek intracellulárisan helyezkednek el.

A csatornát intracelluláris ADP-ribóz (ADPR) és Ca^{2+} együttes jelenléte aktiválja. Az ADPR a C-terminálisan található NUDT9 homológia (NUDT9-H) doménhez kötődik. Amint neve is utal rá, e domén szekvenciája nagy mértékű homológiát mutat a mitokondriális NUDT9 enzimével, amelyhez hasonlóan az izolált

NUDT9-H domén is ADPR-t köt, illetve hidrolizál. E reakció során az ADPR, a két foszfát közötti kötés elhasadása révén, AMP-re és ribóz-5-foszfátra bomlik. Bár a NUDT9-H domén aktivitása csak töredéke a mitokondriális enzimének, e lassú ADPR-hidroláz aktivitásnak szerepe lehet a csatorna szabályozásában.

Egészsejtes mérések során az ADPR csak intra- vagy extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében tudta aktiválni a TRPM2 csatornát. Izolált membrános kísérletek igazolták, hogy a Ca^{2+} kötőhelyei intracellulárisan, bár a pórus közelében, találhatóak: így az extracelluláris Ca^{2+} csak permeációt követően képes kifejteni aktiváló hatását. Ezek az eredmények azt is valószínűsítik, hogy intakt sejtek esetében az aktiváló Ca^{2+} fő forrása az extracelluláris tér lehet.

Milyen jelek aktiválhatják a TRPM2 csatornát az élő szervezetben? Már korán felismerték, hogy a TRPM2 áram összefügg a sejtek redox állapotával. Több tanulmány is megerősítette, hogy az oxidatív stressz (pl. H_2O_2 kezelés) hatására a TRPM2 csatornák aktiválódnak. Bár egy egészsejtes méréseken alapuló tanulmányban bemutatták, hogy a H_2O_2 képes aktiválni egy ADPR-inszenzitív "csonkított" TRPM2 variánst is, ezt az eredményt azóta sem sikerült reprodukálni. Sőt a NUDT9-H domén konzervált Nudix motívumának (RILRQE) azon mutációi, amelyek megakadályozták az ADPR kötődését, az ADPR mellett a H_2O_2 aktiváló hatását is megszüntették. Ezek az eredmények arra utalnak,

hogy a H_2O_2 közvetett módon, az intracelluláris [ADPR] emelésével, befolyásolja a TRPM2 csatorna működését. Tovább bonyolította a képet, amikor kiderült, hogy egészszejtes mérésekben a H_2O_2 megnöveli a TRPM2 csatornák ADPR iránti látszólagos affinitását, ami ismét felvetette egy ADPR-tól független közvetlen aktivációs út lehetőségét is. Számos más anyag (NAD(P)^+ metabolitok) szerepe is felvetődött a TRPM2 szabályozása kapcsán, azonban ezekhez a kísérletekhez is csak egészszejtes méréseket használtak, és a kapott eredmények sokszor ellentmondásosak. Több tanulmány számolt be arról, hogy a ciklikus ADPR (cADPR) aktiválja a TRPM2 csatornát, sőt ADPR-zal együtt alkalmazva fokozzák egymás aktiváló hatását. Azonban más csoportok mérései ezt nem tudták megerősíteni. A nikotinsav-adeninin-dinukleotid-foszfát (NAADP), egy másik intracelluláris Ca^{2+} -ot mobilizáló széleskörűen tanulmányozott ADP-ribozil cikláz termék, is jelentős TRPM2 áramot indukált egészszejtes mérésekben. ADPR-zal együtt alkalmazva ebben az esetben is jelentős szinergiát figyeltek meg a két nukleotid között. A NAD^+ egészszejtes mérésekben tapasztalt alacsony affinitású aktiváló hatását valószínűleg ADPR szennyezés okozza, míg az O-acetilált ADPR aktiváló hatásának jelentősége egyelőre nem ismert. Végül felvetődött, hogy az AMP, mint az ADPR hidrolízis egyik végterméke, gátolhatja az ADPR indukált TRPM2 áramot.

Bár a korábbi egészszejtes mérések számos molekulát azonosítottak, amelyek befolyásolhatják a TRPM2 csatorna

működését, 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 koncentrációinak megváltoztatása révén (közvetett módon) fejt ki hatását. A citoplazmatikus [ADPR] koncentráció szabályozásában több citoplazmatikus, sejtmagi és mitokondriális enzim is részt vesz, amelyek az ADPR termeléséért, lebontásáért, sejtalkotók közötti transzportjáért felelősek. Nagy koncentrációjú adenin nukleotidok intracelluláris dialízise megzavarhatja ezt a szabályozást, hiszen ezek a fent említett enzimek szubsztrátjai vagy termékei lehetnek. Hasonlóképpen, a sejtek Ca^{2+} -mal való túltöltése reaktív oxigén származékok képzésén keresztül ADPR felszabaduláshoz vezethet. Az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -t a belső raktárakból felszabaduló, a plazmamembránon át beáramló, illetve a transzporterek által eltávolított Ca^{2+} dinamikus egyensúlya határozza meg. Mivel a cADPR és az NAADP hatékony Ca^{2+} mobilizáló másodlagos hírvivők, esetükben a $[\text{Ca}^{2+}]$ -t megzavaró közvetett hatás sem zárható ki. A fenti okok miatt a lehetséges modulátorokról az eddig elvégzett egészséjtes kísérletek alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy közvetlen vagy közvetett módon befolyásolják a TRPM2 csatorna működését.

Bár a csatorna fő aktivátorait, a Ca^{2+} -ot és az ADPR-t, a korábbi tanulmányokban már azonosították, 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 irreverzibilisen inaktiválódnak, ezért nem lehet állandó csatornaszám mellett elegendően hosszú méréseket végezni ilyen típusú elemzésekhez. Az áram izolált membrános mérések során tapasztalt lecsengése (rundown) – a technikai nehézségen túl – számos ioncsatorna esetében fontos szabályozási mechanizmusra hívta fel a figyelmet. Például a befelé rektifikáló kálium csatornák, illetve néhány TRPM csatorna működését a membrán foszfo-inozitol tartalma jelentősen befolyásolja. E csatornák aktivációs kapujának nyitásához nélkülözhetetlen a foszfatidil-inozitol-(4,5)-biszfoszfát (PIP₂) jelenléte a plazmamembrán intracelluláris felszínén. Izolált membrános mérések során a membránhoz kötött lipid-foszfátok gyorsan lebontják a szabad PIP₂-t, ami e csatornák áramának lecsengéséhez vezet. Különböző csatornák rundown-jának hátterében számos egyéb mechanizmus is állhat, beleértve a csatorna fehérje defoszforilációját, fontos regulációs alegység disszociációt követő elmosását, vagy cisztein oldalláncok oxidációját, azonban e mechanizmusokat a TRPM2 csatorna esetében korábbi tanulmányok – legalább részlegesen – már kizárták.

Célkitűzések

- A TRPM2 csatorna közvetlen és közvetett modulátorainak azonosítása.
- A vad típusú TRPM2 csatornára jellemző inaktiváció molekuláris mechanizmusának feltárása. Kísérlet e folyamat lassítására.
- A PIP₂ TRPM2 csatornára gyakorolt hatásának vizsgálata.

Felhasznált módszerek

Molekuláris biológia

A mutáns csatornákat kódoló plazmidokat célzott mutagenézis (Stratagene QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit) segítségével állítottuk elő. A pGEMHE-TRPM2 és pGEMSH-TRPM8 cDNS plazmidokat NheI restriktációs enzimmel linearizáltuk. Az elvágott DNS tisztítását követően a cRNS szintéziséhez T7 mMessage mMachine Kit-et (Applied Biosystems) használtunk. A cRNS mennyiségét denaturáló géll segítségével határoztuk meg, a cRNS-t -80°C -on tároltuk.

Petesejtek izolálása és injektálása

A petesejteket sebészileg távolítottuk el afrikai karmosbékákból. A TRPM2 illetve TRPM8 csatornákat kódoló 1-10 ng cRNS-t mikroinjektálással juttatjuk be a petesejtekbe. A méréseket 1-3 nappal az injektálás után végeztük.

Izolált membrános inside-out patch clamp mérések

A patch pipettákat boroszilikát üvegből húztuk, standard 140 mM Na-glukonátos oldatunkkal feltöltve ellenállásuk 2-4 M Ω volt.

Legtöbb mérésünk során a pipetta hegyet körülbelül 1 cm-ig Na-glukonát alapú oldattal töltöttük fel, föléje izoozmotikus NaCl alapú pipettaoldatot rétegeztünk a mérő elektróda számára. A permeabilitási vizsgálatoknál a nátriumot a vizsgált kationra cseréltük. A Na-glukonát alapú kádoldatokat még kiegészítettük a vizsgált anyagokkal. Kontroll körülmények között a szabad $[Ca^{2+}]$ 125 μ M, az [ADPR] 32 μ M volt.

A kiszakított membránfoltot a mérőkamrába helyeztük, ahol a membrán intracelluláris felszínét érő, folyamatosan áramló kádolat összetételét egy komputer-vezérelt perfúziós rendszer (HEKA) segítségével szabadon és gyorsan (<100 ms) cserélhettük. A kádoldatot a referencia elektródhoz 140 mM-os KCl-t tartalmazó sóhiddal kapcsoltuk. A méréseket 25°C-on végeztük. Az elektródák közötti áramot Axopatch 200B (Molecular Devices) erősítővel feszültségjellé alakítottuk, és 2 kHz-en szűrve, 10 kHz-es mintavételezéssel digitalizáltuk. Az így kapott adatokat Pclamp10 program segítségével számítógépen rögzítettük.

A cADPR enzimatiszítás

A cADPR törzsoldatot a jelenlévő ADPR szennyeződéstől I-es típusú nukleotid pirofoszfátáz enzim (P7383, Sigma) alkalmazásával tisztítottuk meg. A 24 kDa molekulatömegű enzimet

3 kDa-os vágópontú filteren (Z629367, Sigma) történő kétszeri átszűréssel távolítottuk el.

Vékonyréteg kromatográfia (TLC)

A mérés során használt nukleotidok (cADPR, ADPR, NAADP, NAAD) törzsadatainak tisztaságát TLC-vel ellenőriztük. A nukleotidokból 10-100 nmol-t 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.

Eredmények

1. Bár a korábbi, döntően egészséjtes méréseken alapuló tanulmányok számos molekulát azonosítottak, amelyek befolyásolhatják a TRPM2 csatorna működését, az ilyen méréseknél a sejt nukleotid és Ca^{2+} homeosztázisát biztosító intracelluláris rendszerek jelen vannak, ezért nem volt egyértelműen eldönthető, hogy ezek az anyagok a csatornához kötődve (közvetlen módon) vagy csak az elsődleges ligandok, a Ca^{2+} és az ADPR, lokális koncentrációinak megváltoztatása révén (közvetett módon) fejtik-e ki hatásukat. Az általunk használt izolált membrános méréseknél e rendszerek nincsenek jelen, így a közvetlen és a közvetett modulátorok könnyen elkülöníthetőek. Ezért fontosnak tartottuk, hogy ezeknek az anyagoknak a hatását mi is megvizsgáljuk. Eredményeink szerint a H_2O_2 és az AMP közvetlen módon nem befolyásolja a TRPM2 csatorna működését. Bár a kereskedelmi forgalomban kapható cADPR a mi méréseinkben is aktiválta a TRPM2 csatornákat, a törzsoldat ellenőrzése során kiderült, hogy a készítmény jelentős mennyiségű ADPR szennyezést tartalmaz. A megtisztított cADPR már nem rendelkezett aktiváló hatással. Méréseinkben az NAADP alacsony affinitású parciális agonistának bizonyult. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a TRPM2 közvetlen aktivátorai a Ca^{2+} és az ADPR. A H_2O_2 feltehetően ADPR, míg a cADPR Ca^{2+} felszabadítása révén aktiválhatja a TRPM2 csatornát.

Bár az NAADP közvetlen módon is képes volt TRPM2 áram kiváltására, alacsony affinitása miatt a Ca^{2+} mobilizálásán keresztül megvalósuló közvetett hatása ennél sokkal jelentősebb lehet. Az AMP hatásmechanizmusa továbbra is nyitott kérdés.

2. A TRPM2 áram lecsengésének molekuláris hátterét keresve összehasonlítottuk az inaktiváció sebességét különböző körülmények között. Eredményeink szerint az inaktivációt nem a membrán PIP_2 tartalmának depléciója okozza, ugyanakkor igazoltuk, hogy a folyamat állapotfüggő – zárt csatornában közel tízszer lassabb, mint nyitottakban – és érzékeny a permeáló ionok fajtájára és koncentrációjára. 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. Egy korábbi tanulmány azonosított két negatív töltésű, és egy semleges aminosav oldalláncot a TRPM4 feltételezett szelektáló filterében, amelyek eltávolítása a mutáns csatorna gyors inaktivációjához vezetett – ezek az aminosavak a TRPM4 és a TRPM5 esetében is megtalálhatóak, a TRPM2-ben viszont nincsenek jelen. Ezért megvizsgáltuk, hogy negatív töltések bevitele, illetve a hiányzó aminosav inzertálása stabilizálja-e a TRPM2 pórust, ezzel megszüntetve az inaktivációt. Mivel a TRPM2 ezen régiója jobban hasonlított a TRPM5-éhez, ezért ez utóbbit választottuk templátnak. Izolált membrános méréseinkben az ilyen alapon készített mutációk jelentősen

lelassították a csatornák inaktivációját, sőt a mindhárom mutációt tartalmazó, TRPM5-szerű pórusal rendelkező, T5L csatorna árama még egy óra elteltével is alig változott. Bár a T5L csatorna pórusmérete nem változott ($\sim 7 \text{ \AA}$), a különböző Na^+ , Ca^{2+} , és Mg^{2+} koncentrációk mellett mért egyedi csatorna vezetőképesség értékek alapján a csatorna permeáló ionok iránti látszólagos affinitása jelentősen megnövekedett. A pórusmutánsokban bekövetkezett látszólagos affinitás-növekedés sokkal kifejezettebb volt a kétértékű kationok vonatkozásában, azonban ez egyik esetben sem társult a maximális vezetőképesség növekedésével. Erre a legkézenfekvőbb magyarázat, hogy alacsony ionkoncentrációknál a bevitt negatív töltések elektrosztatikus hatása megnöveli a lokális kation koncentrációt a pórus szájadékánál, így balra tolva a koncentráció-vezetőképesség összefüggést. Emellett összehasonlítottuk a T5L mutáns és a vad típusú TRPM2 csatorna ADPR és Ca^{2+} függő kapuzását makroszkópus és steady-state egyedi csatorna mérések segítségével is. Azt találtuk, hogy a T5L mutáns kapuzásának ADPR és Ca^{2+} -függő szabályozása nagyon hasonló maradt a vad típuséhoz. Vagyis a T5L csatorna kiváló modell lehet a TRPM2 csatorna kapuzásának egyedi-csatornás méréseken keresztül történő részletes vizsgálatához.

3. Bár eredményeink szerint a PIP_2 nem játszik szerepet a TRPM2 inaktivációjában, más hatása még lehet erre a csatornára. 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 PIP₂ molekulák negatív töltésű foszfo-inozitol csoportjait, ezáltal csökkentve az ionszűrő csatornák számára hozzáférhető szabad PIP₂ mennyiségét. Eredményeink szerint magas koncentrációjú polilizin hatására a vad típusú TRPM2 csatornák árama gyorsan csökken, azonban a polilizin elvonása után az áram PIP₂-vel helyreállítható. Ez arra utal, hogy a polilizin gátló hatása valóban a PIP₂ depléciójának következménye. Fontos megjegyezni, hogy polilizin jelenlétében a nem inaktiválódó T5L csatornák is ugyanígy viselkednek, vagyis a membrán szabad PIP₂ tartalmának teljes "maszkolása" ebben az esetben is az aktivációs kapu záródásához vezet. A polilizin gátló hatása reverzibilis, a szabad polilizin elmosása után a csatornák PIP₂ alkalmazása nélkül is lassan reaktiválódnak. Kísérleteink arra is rávilágítottak, hogy a PIP₂ depléció a csatorna Ca²⁺ iránti látszólagos affinitását csökkenti. Amíg kontroll körülmények között 125 μM Ca²⁺ maximálisan aktiválja a T5L mutánst, addig közvetlenül a polilizin elmosása után még a fél-maximális áramhoz is több, mint 1 mM Ca²⁺-ra volt szükség. Ugyanakkor az áram lassú reaktivációja során a Ca²⁺ érzékenység is helyreállt. Ennek fényében azt is megvizsgáltuk, hogy előzetes polilizin kezelés nélkül, PIP₂ adásával vajon növelhető-e a TRPM2 Ca²⁺ affinitása. Telítési (32 μM) ADPR mellett, 50 μM PIP₂ alkalmazása szignifikánsan növelte 4 μM Ca²⁺ relatív aktiváló hatását mind a vad típusú, mind a T5L csatorna esetében. Ez

alátámasztja, hogy nagy koncentrációjú PIP_2 , ha csak kis mértékben is, de növeli a TRPM2 csatornák Ca^{2+} iránti látszólagos affinitását.

Következtetések

- A H_2O_2 , az AMP és a cADPR a TRPM2 csatorna közvetett modulátorai, míg az NAADP és az NAAD alacsony affinitású parciális agonisták.
- A TRPM2 csatorna irreverzibilis inaktivációját, a feszültségfüggő K^+ csatornák C-típusú inaktivációjához hasonlóan, a szelektáló filter konformáció változása okozhatja. A szelektáló filter konformációját stabilizáló mutációkkal sikerült az inaktivációt lassítanunk, illetve megszüntetnünk. Bár a nem inaktiválódó T5L mutáns permeációs tulajdonságai jelentősen megváltoztak, kapuzásának kinetikai paraméterei, valamint ADPR és Ca^{2+} iránti affinitása nem változott, ezért kiváló eszköz lehet a TRPM2 csatorna kapuzásának egyedi-csatornás méréseken keresztül történő vizsgálatához.
- Bár a PIP_2 nem befolyásolja a vad típusú csatorna irreverzibilis inaktivációját, a membrán szabad PIP_2 tartalmának polilizin általi teljes "maszkolása" a TRPM2 Ca^{2+} iránti affinitását drámaian csökkenti, ami a csatornák záródásához vezet. Ugyanakkor, a polilizin előzetes alkalmazása nélkül, a PIP_2 csak kismértékben fokozza a TRPM2 Ca^{2+} iránti affinitását. Figyelembe véve, hogy a mérések kezdetekor a membránban fellelhető minimális PIP_2 elegendő a TRPM2 közel maximális

aktivitásának fenntartásához, feltételezhető, hogy a TRPM2 nagy affinitással köti a PIP₂ -t.

Saját publikációk jegyzéke

A PhD 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 Nat. Acad Sci USA* **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