

Szakmai beszámoló – OTKA-F 68143 (Csanády)

1. Humán TRPM2 csatornák direkt vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer létrehozása

A TRPM2 egy kation csatorna, amelyet Ca^{2+} és ADP ribóz (ADPR) aktivál. A projekt indulásakor először is létre kellett hoznunk egy, e csatornák vizsgálatára alkalmas, kísérleti rendszert. Az Origene cégtől vásárolt humán vad típusú TRPM2 (WT hTRPM2) cDNS-t beklónoztuk a pGEMHE Xenopus oocyta expressziós plazmidba, majd a felszaporított, tisztított cDNS-ből in vitro transzkripcióval WT hTRPM2 cRNS-t állítottunk elő. A hTRPM2 békapetesejtben, inside-out patch-ben, történő vizsgálatához ki kellett iktatnunk e sejtek endogén Ca^{2+} aktivált Cl^- áramát. Szimmetrikus 140 mM-os Na-glukonát oldatban (két sóhid alkalmazásával) az intracelluláris Ca^{2+} nem indukál endogén áramot. WT hTRPM2 cRNS-sel injektált petesejtből izolált patchben viszont citoszolikus Ca^{2+} és ADPR együttes alkalmazása nagy kation áramot indukál. Az áram az aktiváló ligandok fenntartott jelenléte mellett is hamarosan deaktiválódik (rundown), e jelenség kalmodulin perfúziójával nem fordítható vissza. Az egyedi csatornák konduktanciája ~ 50 pS. Ezek az alapvető tulajdonságok megegyeznek az irodalomban közölt adatokkal, és azt mutatják, hogy a hTRPM2 sikeresen fejezhető ki a békapetesejtben. Mivel a TRPM2-t intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ aktiválja, meg kellett határoznunk glukonát alapú oldatainkban a szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -t. Ezért Ca-Green 5N fluoreszcens festék segítségével titrálásos módszerrel megmértük a glukonát Ca^{2+} affinitását. A Ca-glukonát K_d -je ~ 20 mM-os, így az oldatokhoz hozzáadott összes Ca^{2+} kb. 1/8-ad része szabad, amit a direkt mérések meg is erősítettek. Újonnan beállított inside-out patch-clamp kísérleti rendszerünk lehetővé tette az intracelluláris ligand koncentrációk direkt és gyors kontrollját, különböző membránpotenciálokon hirtelen koncentrációváltásokra kapott makroszkópos válaszok kinetikájának, illetve egyedi ion csatornák steady-state kapuzásának tanulmányozását.

2. A primer aktivátorok hatásmechanizmusának vizsgálata**2.1. A Ca^{2+} aktiváció mechanizmusa, és az aktiváló Ca^{2+} kötőhelyeinek térbeli elhelyezkedése**

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

Magas (1 mM) extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenléte nincs hatással a csatornák nyitási sebességére, tehát a csukott csatornák nem érzékelik az extracelluláris Ca^{2+} -ot. Amint azonban egy csatorna megnyílik, a pórusán beáramló Ca^{2+} késlelteti a csatorna becsukódását, mert telítésben tartja az aktiváló kötőhelyeket – dacára az intracelluláris felszín Ca^{2+} -mentes oldattal történő folyamatos, gyors mosásának. Az aktiváló kötőhelyek tehát a csatorna kapujától intracelluláris irányban helyezkednek el, de nem a csatorna fehérje felszínén, hanem egy mély üregben (vesztibulumban), a pórus bemenetének közvetlen közelében. Ezt a következtetést megerősíti, hogy pozitívabb membránpotenciálok alkalmazásakor az extracelluláris Ca^{2+} kapuzásra gyakorolt hatása a Ca^{2+} beáramlás hajtóerejének csökkenésével arányosan csökken.

A TRPM2-t koincidencia detektornak tekintik amely az intracelluláris [ADPR] és $[Ca^{2+}]$ együttes emelkedését jelzi. Azonban eredményeink alapján e két ligand TRPM2-re gyakorolt hatásának teljesen más a dinamikája: fiziológiás körülmények között (intakt sejten, magas extracelluláris $[Ca^{2+}]$ mellett) a TRPM2 saját aktivitása révén regenerálja egyik aktiváló ligandját (az intracelluláris Ca^{2+} -ot). Néhány μM intracelluláris ADPR jelenlétében tehát egyetlen rövid Ca^{2+} szignál is elegendő lehet ahhoz, hogy elnyújtott, önfenntartó TRPM2 aktivitást váltson ki.

E munkánk tavaly a *J. Gen. Physiol.* címlapjára került (*J. Gen. Physiol.* 133:189-203), és azóta alapul szolgált a csatorna savanyú pH okozta gátlásának értelmezéséhez. Az erről megjelent két, ránk hivatkozó, cikk egyikéhez (*J. Physiol.* 588:1227-1240) a *J. Physiol.* szerkesztősége engem kért fel egy a cikket kísérő "Perspective" megírására (*J. Physiol.* 588:1661-1662).

2.2. Az ADPR aktiváció mechanizmusa, az ADPR hidrolízisének szerepe a kapuzásban

Megmértük a TRPM2 áram [ADPR]-függését telítési (125 μM -os), illetve közel féltelítési (15 μM -os) $[Ca^{2+}]$ jelenlétében; a félmaximális aktiválást biztosító [ADPR] 1.1 ± 0.2 illetve 3.7 ± 0.6 μM -nak adódott a két esetben, azaz az ADPR iránti látszólagos affinitás inside-out patch-ben kevésbé érzékeny az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -ra.

Az ADPR-hidrolízisének a csatorna kapuzásában betöltött szerepét nem tudtuk meggyőzően tisztázni. Ez az aktivitás a homológ NUDT9 enzimének kb. 1%-a, $\sim 0.1 s^{-1}$, más szerzők szerint nem is mérhető. Felvetődött, hogy e lassú ADPR hidrolízis a G_{α} -fehérjék GTPáz aktivitásához hasonló időzítő mechanizmus, amely korlátozza az aktív periódus időtartamát. E feltevés értelmében a csatornák ADPR hirtelen megvonását követő csukódási sebessége az ADPR hasítás sebességét tükrözi. Méréseink alapján ez a csukódási sebesség $\sim 0.2 s^{-1}$. Az ADPRázok konzervált "Nudix-box" motívuma (konszenzus **REFXEE**) a TRPM2 NUDT9-H doménjében atípusos (**RILRQE**). A NUDT9 enzimben az **EF**→**IL** mutáció (ld. TRPM2) 1%-ára csökkenti, az **EE**→**KK** mutáció felfüggeszti az ADPRáz aktivitást. Ennek analógiájára létrehoztunk egy feltételezhetően "inaktív" **QE**→**KK** (Q1408K/E1409K) és egy feltételezhetően "hiperaktív" **IL**→**EF** (I1405E/E1406F) TRPM2 mutánst. Meglepetésre e négy egyedi és két dupla mutáció egyike sem befolyásolta az ADPR iránti affinitást és az ADPR-elvonást követő csukódási sebességet. E mutációk kapuzásra kifejtett hatásának hiányát magyarázhatja, (a) ha a Nudix-box oldalláncok nem szükségesek a katalízishez, (b) ha a NUDT9-H domén eleve katalitikusan inaktív, vagy (c) ha az ADPR hasításának nincs hatása a kapuzásra. A (c) lehetőség valószínűtlen, mert méréseink alapján a hasítási termékek sem önmagukban, sem együtt nem aktiválják a csatornát (ld. 3.3). Az (a) lehetőség mellett szól a homológ NUDT9 enzim kristályszerkezete, amelyben a Nudix-boxnak megfelelő α -hélix főként a szerkezet stabilizálását szolgálja, és amely felvetette, hogy a katalízis kémiai mechanizmusa nem teljesen konzervált az ADPRázok között. E kristályszerkezet alapján további célzott mutációkat tervezünk az ADPR hasítás funkcionális szerepének tisztázására.

3. Másodlagos modulátorok hatásmechanizmusának vizsgálata

3.1. H_2O_2 direkt módon nem aktiválja a csatornát

A TRPM2 intakt sejtekben H_2O_2 kiváltotta oxidatív stressz során aktiválódik. Az irodalom alapján vitatott volt, hogy a H_2O_2 direkt módon hat-e a csatornára. Ezért megvizsgáltuk, hogy (i) H_2O_2 önmagában aktiválja-e a csatornát, valamint, hogy (ii) esetleg potenciózza az ADPR aktiváló hatását. Azonban 1 mM H_2O_2 önmagában nem aktivált, és nem befolyásolta sem a csatornák ADPR

iránti érzékenységét, sem az ADPR-kiváltotta TRPM2 áram nagyságát, függetlenül az alkalmazott $[Ca^{2+}]$ -tól.

3.2. AMP direkt módon nem gátolja a csatornát

Az irodalom alapján az AMP intakt sejtekben gátolja a TRPM2 aktivitást ($K_i=70 \mu\text{M}$). Méréseink alapján telítési $[ADPR]$ ($32 \mu\text{M}$) mellett $100 \mu\text{M}$ AMP-nek izolált patch-ben nem volt számottevő gátló hatása. Egy esetleges kompetitív mechanizmust feltételezve megvizsgáltuk, hogy alacsonyabb, $3.2 \mu\text{M}$ -os, $[ADPR]$ mellett sem látszik-e gátló hatása az AMP-nek, azonban $200 \mu\text{M}$ AMP sem volt képes csökkenteni a $3.2 \mu\text{M}$ ADPR által aktivált áramot. Ezen eredmények nem függték az alkalmazott $[Ca^{2+}]$ -tól, valamint az ADPR és az AMP alkalmazási sorrendjétől.

3.3. A ciklikus ADP-ribóz (cADPR) direkt módon nem aktiválja a csatornát

Az irodalom alapján a cADPR önmagában csak kis mértékben aktiválja a TRPM2-t, viszont $10 \mu\text{M}$ cADPR nagymértékben potenciózza az aktiváló ADPR hatását (100 -ad részére csökkenti az ADPR $K_{1/2}$ értékét). Izolált patch-ben végzett első méréseinkben azt tapasztaltuk, hogy a cADPR önmagában is maximálisan aktivált (látszólagos affinitása $1.6\pm 0.3 \mu\text{M}$), viszont $1 \mu\text{M}$ cADPR jelenléte nem befolyásolta az ADPR látszólagos affinitását. Kézenfekvő magyarázatnak látszott, hogy a cADPR maga hatástalan, de jelentős mértékben szennyezett ADPR-zal. Valóban, kollaborációban végeztetett tömegspektrometriás mérések a Sigma-tól vásárolt cADPR-unkban kb. 50% (!) ADPR szennyeződést találtak. Ezt követően kidolgoztunk egy technikát a cADPR megtisztítására. Nukleotid pirofoszfátáz enzimmel a szennyező ADPR elbontható AMP-re + ribóz-5-P –ra, majd az enzim szűréssel eltávolítható. Az eljárást vékonyréteg kromatográfiával teszteltük, amely bizonyította, hogy a szennyező ADPR valóban 100% -osan elbomlott AMP-vé; kontroll kísérletek pedig megerősítették, hogy a szűrés az enzimet is teljes mértékben eltávolítja. Ezek után megvizsgáltuk az ilyen módon tisztított cADPR TRPM2-re gyakorolt hatását izolált patch-ben. $10 \mu\text{M}$ tisztított cADPR-nak önmagában nem volt hatása, és nem befolyásolta a 0.1 vagy $1 \mu\text{M}$ ADPR által kiváltott TRPM2 áramot sem. A $10 \mu\text{M}$ -os tisztított cADPR oldat ugyan tartalmazott kb. $10 \mu\text{M}$ AMP-t és $10 \mu\text{M}$ ribóz-5-P-ot is, azonban e két utóbbi vegyület sem külön-külön, sem együttesen adva nem befolyásolták a csatornák aktivitását, így ez nem magyarázhatja a cADPR hatásának teljes hiányát.

Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy a H_2O_2 és a cADPR intakt sejtekben mért aktiváló, valamint az AMP gátló, hatása nem a TRPM2-re gyakorolt direkt hatások, hanem valószínűleg az ADPR celluláris metabolizmusának, és/vagy az intracelluláris Ca^{2+} szintnek, a befolyásolásán alapulnak. A cADPR esetén oki tényezőként felmerül a használt vegyszerek ADPR-zal való nagyfokú szennyezettsége is.

3.4. A nikotinsav-adenin-dinukleotid foszfát (NAADP) kis affinitású parciális agonista

Az irodalom alapján az NAADP önmagában kis affinitással aktiválja a TRPM2-t, viszont erősen szinergizál az ADPR-zal. Vékonyréteg kromatográfiás méréseink alapján a Sigma NAADP nem szennyezett ADPR-zal. Izolált patch-ben az NAADP önmagában kis affinitású parciális agonistaként viselkedett: $K_{1/2}\sim 100 \mu\text{M}$, viszont a telítési $[NAADP]$ által kiváltott maximális csatorna-aktivitás csak kb. 50% -a az ADPR-zal kiváltható aktivitásnak. Szinergiát vizsgáló

méréseink nem találtak számottevő kooperativitást az NAADP és az ADPR hatása között. Összességében az NAADP kis affinitású parciális agonista, és nem szinergizál az ADPR-zal.

3.5. A nikotinsav-adenin-dinukleotid (NAAD) kis affinitású teljes agonista

Miután az NAAD szerkezetileg közelebb áll az ADPR-hoz mint az NAADP, megvizsgáltuk e molekula hatását is a TRPM2 aktivitására. Az NAAD direkt módon aktiválta a csatornákat, de affinitása csak kissé volt nagyobb mint az NAADP-nek ($K_{1/2}=35 \mu\text{M}$). Ezzel szemben telítési [NAAD] az ADPR-zal összevethető mértékben aktivált, azaz az NAAD kis affinitású teljes agonistaként jellemezhető.

A másodlagos modulátorok hatásmechanizmusát vizsgáló munkánkat a *J. Biol. Chem.* folyóirat közlésre elfogadta (doi/10.1074/jbc.M109.066464).