

MTA doktori értekezés tézisei

A TRESK háttér kálium csatorna molekuláris szabályozási mechanizmusainak vizsgálata

Dr. Czirják Gábor

**Semmelweis Egyetem
Élettani Intézet**



Budapest, 2020

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS, A KITŪZÖTT KUTATÁSI FELADAT ÖSSZEFOGLALÁSA.....	2
2. CÉLKITŪZÉSEK.....	4
3. A KÍSÉRLETEK RÖVID LEÍRÁSA, MÓDSZEREK.....	5
3.1 Molekuláris biológia.....	5
3.1.1 A TRESK háttér K^+ csatorna gén azonosítása.....	5
3.1.2 DNS konstrukciók előállítása.....	5
3.1.3 cRNS szintézis.....	6
3.2 Kísérleti állatok, a <i>Xenopus</i> petesejtek mikroinjektálása.....	6
3.3 Elektrofiziológia.....	6
3.3.1 Két elektródos feszültségzár (voltage clamp) mérések.....	6
3.3.2 Teljes sejt, kivágott folt és egyedi csatornás patch clamp mérések.....	7
3.4 Fehérjéssel végzett kísérletek.....	7
3.4.1 Rekombináns fehérjék termelése <i>E. coli</i> expressziós rendszerben.....	7
3.4.2 Interakciós partnerek azonosítása immobilizált csali fehérjéssel.....	8
3.4.3 Kináz és foszfatáz reakciók immobilizált szubsztrát fehérjéssel.....	8
4. A TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA.....	9
4.1 A TRESK és $K_v8.2$ K^+ csatorna klónozása, alapvető elektrofiziológiai és farmakológiai tulajdonságaik meghatározása.....	9
4.2 A különböző G-fehérjékhez kapcsolt receptorok TRESK csatornára kifejtett hatásának vizsgálata.....	9
4.3 A G_q -fehérjéhez kapcsolt receptorok erőteljes TRESK aktiváló hatását közvetítő mechanizmus felderítése.....	10
4.4 A TRESK kalcium-függő szabályozásának vizsgálata. Közvetlenül a csatornához kötődve fejt ki a hatását a Ca^{2+} ion, vagy közvetett úton?.....	11
4.5 A kalcium/kalmodulin-függő protein foszfatáz kalcineurin által defoszforilált, TRESK szabályozásban fontos, aminosav oldalláncok azonosítása.....	11
4.6 A TRESK csatorna és a kalcineurin fehérje-fehérje interakciójának vizsgálata	13
4.7 Kináz enzim(ek) azonosítása, amelyek a kalcineurin célpont szereket foszforilálják és ezáltal a TRESK csatornát gátolják.....	15
4.8 További TRESK interakciós fehérje partnerek keresése. A 14-3-3 állványfehérje TRESK szabályozásban betöltött szerepének vizsgálata.....	16
4.9 Az új (novel) típusú protein kináz C (PKC) a TRESK csatornát a szerin klaszter közvetett defoszforilációján keresztül aktiválja.....	16
4.10 A TRESK csatornát gátló farmakológiai ágensek azonosítása.....	17
5. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI.....	18
6. A MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	19
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	22
8. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK, RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA.....	23

1. BEVEZETÉS, A KITŰZÖTT KUTATÁSI FELADAT ÖSSZEFOGLALÁSA

A plazmamembrán jelentős kálium permeabilitását már abban a korszakban felismerték, amikor az elektrofiziológiai alapfogalmak az ionszűrő működéséről és a membránpotenciálról még csak kialakulóban voltak. A Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) homogén transzmembrán télerősség modell (constant-field theory) kidolgozásánál, a negatív nyugalmi membránpotenciál kialakulásának magyarázatára, feltételezték a sejtmembrán nagy kálium konduktanciáját. Ezt a nagy nyugalmi K^+ vezetőképességet legmegfelelőbben azzal lehetett értelmezni, hogy a membránban K^+ ionra szelektív pórusok találhatóak, amelyeken keresztül háttér (csurgó, "leak") K^+ áram folyik. A GHK áram-egyenlet lényegében helyesen megadja, hogyan alakul a háttér K^+ csatornák feszültség-áram összefüggése az intra- és extracelluláris kálium koncentráció függvényében. Ennek az 1940-es években elért jelentős elméleti áttörésnek ellenére, mintegy fél évszázadig nem sikerült a háttér K^+ áramot létrehozó molekuláris struktúrákat, csatornafehérjéket azonosítani.

A háttér K^+ csatornák felfedezését a molekuláris biológia fejlődése és a humán genom szekvenálás tette lehetővé. Az elsőként felfedezett emlős háttér K^+ csatornát, a TWIK-1 (Tandem of pore domains in a Weakly Inwardly rectifying K^+ channel) cDNS-ét, 1996-ban klónozták. A TWIK-1 alegység két K^+ csatorna pórusdomént is tartalmaz és ez a szerkezeti sajátosság a későbbiekben a többi háttér K^+ csatornára is jellemzőnek bizonyult, ebből adódott az új K^+ csatorna család K_{2P} elnevezése. Az 1996 és 2003 közötti időszakban az emberi K_{2P} csatorna család gyorsan kibővült a klónozási erőfeszítések eredményeként. Ma 15 gént sorolnak ide, amelyeket hat alcsoportba osztanak (TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK és TRESK). Meglepetést okoztak a kezdeti vizsgálatok abban a tekintetben, hogy mennyire különböznek a K_{2P} családba tartozó csatornák egymástól aminosav szekvencia szinten és funkcionális szempontból egyaránt, illetve milyen váratlanul sokféle módon szabályozódnak a membránpotenciál változásától függetlenül. A későbbiekben nyilvánvalóvá vált, hogy a K_{2P} csatornák megtalálhatók lényegében minden vizsgált állat- és növényfajban és ezek a csatornák a plazmamembrán szabályozott K^+ konduktanciájának általános meghatározói az élővilágban.

Munkacsoportunk hamar bekapcsolódott a K_{2P} csatornák kutatásába. Elsőként közöltük, hogy a TASK-1 csatorna nagy mennyiségben kifejeződik a mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtekben és angiotenzin II általi gátlása szerepet játszik a sejt aldosteron termelésének szabályozásában. Kimutattuk, hogy a G_q -fehérje kapcsolt receptorok a foszfolipáz C aktiváláson keresztül hoznak létre TASK-1 gátló hatást. Emellett elsőként igazoltuk, hogy a TASK-1 és TASK-3 alegységek heterodimert képeznek. Ezek a vizsgálatok az MTA doktori értekezésben bemutatott munka előzményeinek tekinthetők.

Munkánk kezdetén a TRESK (**TWIK-Related Spinal cord K⁺ channel**) háttér K⁺ csatorna nem volt ismert. 2001-ben egy saját fejlesztésű számítógép programmal azonosítottam a TRESK csatorna génjét a frissen közzétett, akkor még nem annotált humán genom szekvenciában. A szekvencia információ alapján megklónoztuk a humán és egér TRESK csatorna cDNS-ét. Ez tette lehetővé, hogy a csatorna felfedezését leíró három munkacsoport közé bekerüljünk és a TRESK receptor-mediált szabályozását elsőként vizsgáljam.

Kimutattuk, hogy a TRESK a korábban leírt K_{2P} háttér K⁺ csatornáktól eltérő módon szabályozódik a G_q-fehérje kapcsolt receptor ingerlés hatására. Míg az egyéb, pl. TREK és TASK, K_{2P} csatornákat az ilyen receptor ingerlés gátolja, vagy nem befolyásolja, addig a TRESK árama kifejezetten nő, pl. a *Xenopus* petesejt heterolog rendszerben 5-10-szeres fokozódása jellemző. A nagyfokú TRESK aktivációt a citoplazma kalcium koncentrációjának növekedése hozza létre. Mivel a kalcium-függő folyamatok gyakran kiemelt élettani jelentőségűek, a TRESK csatorna molekuláris szabályozási mechanizmusait részletesen kezdtük vizsgálni. Kutatómunkánk eredményeképpen a következő 15 évben a TRESK szabályozásáról számos eredeti megfigyelést elsőként közöltünk az irodalomban.

Az utóbbi néhány évben egyre pontosabban kezdjük megérteni a TRESK csatorna élettani és patofiziológiai jelentőségét, melyet a megelőző évtizedben csaknem teljesen homály fedett. RNS szekvenálási módszerekkel kimutatták, hogy a TRESK csatorna a legszelektívebben kifejeződő K⁺ csatorna a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok szenzoros neuronjaiban. Jelentős mennyiségben megtalálható a TRESK a fájdalomérzésért felelős bizonyos érzőneuron szubpopulációkban, és befolyásolja ezek ingerlékenységét, illetve a fájdalmas ingerre adott válasz intenzitását. A TRESK génhiányos (knock-out) egér modellben fokozott érzékenység jelentkezik a fájdalmas mechanikai, hő és kémiai ingerekre a feji régióban. Ezzel jó összhangban a TRESK egyes domináns-negatív mutációi az öröklődő migrénes fejfájás egy ritka formáját okozzák. Az a kép kezd tehát kibontakozni, hogy a TRESK csatorna befolyásolja a nociceptív primer szenzoros neuron ingerlékenységét és ezen keresztül a fájdalomérzést.

Vizsgálataink során arra törekedtünk, hogy a TRESK csatorna olyan általános és közvetlen szabályozó mechanizmusait tanulmányozzuk heterolog rendszerekben, amelyek nagy valószínűséggel a csatornát kifejező sejtípustól függetlenül érvényesülnek. Az általunk leírt mechanizmusok jelentős része tehát jó eséllyel működik a nociceptív szenzoros neuronokban és ezek ismerete biztos támpontot ad a további, TRESK csatorna fájdalomérzésben betöltött szerepének megismerésére irányuló vizsgálatokhoz.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Korábban nem ismert K^+ csatorna gének azonosítása a humán genom szekvenciájában (2000-2002). Az azonosított csatornák cDNS-ének klónozása, a csatornák kifejezése heterolog rendszerben és alapvető elektrofiziológiai tulajdonságaik jellemzése.
2. A TRESK háttér K^+ csatorna receptor-mediált szabályozásának kimutatása. A G_q -fehérje kapcsolt receptorok hatásának vizsgálata, a TRESK csatorna aktivációjához vezető jelpálya felderítése.
3. A kalcineurin foszfatáz által defoszforilált aminosavak azonosítása a TRESK szekvenciában. A kalcineurin TRESK csatornára kifejtett hatásának elemzése molekuláris szinten. A kalcineurin-TRESK fehérje interakciót kialakító szerkezeti elemek meghatározása.
4. A TRESK csatornafehérjéhez *in vitro* kötődő interakciós fehérjék keresése. Első lépések a 14-3-3 adapter fehérje és a TRESK ioncsatorna kapcsolódás funkcionális jelentőségének megértése felé.
5. A TRESK csatorna regulációs szerinjeit foszforiláló kinázok azonosítása. A kinázok TRESK gátló hatásának vizsgálata heterolog rendszerben.
6. A protein kináz C (PKC), mások által korábban közölt, TRESK áramot növelő hatásának vizsgálata. A PKC-függő TRESK aktiváció mechanizmusának felderítése a *Xenopus* heterolog expressziós rendszerben.
7. A TRESK csatornát befolyásoló farmakológiai ágensek azonosítása, kísérletes felhasználás céljából.

3. A KÍSÉRLETEK RÖVID LEÍRÁSA, MÓDSZEREK

3.1 Molekuláris biológia

3.1.1 A TRESK háttér K⁺ csatorna gén azonosítása

A humán genomban a K⁺ csatorna szelektivitási filterre jellemző G(Y/F/L)G aminosavaknak megfelelő GGX XXX GGX DNS szekvencia részleteket kerestünk. Az ezek körül található DNS szekvencia által kódolt aminosavakat összehasonlítottuk a már ismert K⁺ csatornák pórusdoménjainak konzervált régióival. Ennek alapján pontszámot rendeltünk az adott genom pozícióhoz. A legmagasabb pontszámot elérő szekvenciák között két még nem ismert K⁺ csatorna gént azonosítottunk. Mindkettőt megklónoztuk és részletesen vizsgáltuk. Az egyik gén egy feszültségfüggő K⁺ csatorna alegységet kódolt (Kv8.2), amelyről azt találtuk, hogy a retina fotoreceptor sejtjeiben kifejeződik nagy mennyiségben és hozzájárul a fényre adott elektromos válasz kialakításához. A másik gén a TRESK csatornát kódolta. A humán TRESK klónt az exonoknak megfelelő genomiális DNS-ből sokszorozott PCR fragmensekből építettük össze, mivel nem találtunk olyan humán cDNS forrást, amely a csatornát tartalmazta volna. Az egér TRESK klónt kisagy mRNS-ből sokszoroztuk RT-PCR segítségével.

3.1.2 DNS konstrukciók előállítása

A humán és az egér genom annotálását és a szekvencia (pl. EST) adatbázisok robbanásszerű fejlődését követően a cDNS-ek klónozása sokkal könnyebbé vált. Ezért a munkánkhöz szükséges további klónokat (pl. 14-3-3 izoformák, kinázok, stb.) rutinszerűen RT-PCR módszerrel készítettük el, különböző egér szövetekből tisztított RNS felhasználásával. Ritka kivételként (pl. kalcineurin) a szükséges klónt más kutatók bocsátották rendelkezésünkre. A kódoló régiókat egyes esetekben az emlős sejtvonalak tranziens transzfekciójához szükséges (pl. pcDNA3, pIRES-CD8, pCI) vektorokba szubklónoztuk. Ennél még gyakrabban a pEXO és pXEN *Xenopus* expressziós vektorokat használtuk, amelyek az inzert körül az mRNS stabilitást fokozó *Xenopus* globin 5' és 3' nem transzlált régiókat is tartalmazták. A fúziós fehérjéket pGEX (GST, Amersham) vagy pET (His₆, Novagen) vektorok segítségével készítettük. Klónjainkból számos további pontmutánst, vagy egyéb módosított szekvenciájú konstrukciót alakítottunk ki. Ezek előállításához a QuikChange™ (Stratagene) *in vitro* mutagenézis módszert vagy egyéb általánosan használt PCR alapú megoldást alkalmaztunk. A tézisekben vázolt kutatási időszakban saját kezű munkám eredményeképpen vagy közvetlen irányítással több mint 600 plazmid konstrukciót állítottunk elő. A közleményekben közölt klónok szekvenciájának helyességét automata szekvenálással igazoltuk.

3.1.3 cRNS szintézis

A különböző inzertet tartalmazó pEXO vagy pXEN vektorokat a 3' nem transzlált régiót követő ponton a megfelelő restrikciós enzimmel linearizáltuk, majd ebből a gyártó utasításait követve cRNS-t szintetizáltunk az mMMESSAGE mMACHINE™ T7 *in vitro* transcription kittel (Ambion). A cRNS minőségét formaldehides denaturáló agaróz gélelektroforézissel, etídium-bromid festéssel ellenőriztük.

3.2 Kísérleti állatok, a *Xenopus* petesejtek mikroinjektálása

Kísérleteinkben afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*), egér (*Mus musculus*, főként NMRI törzs) és patkány (*Rattus norvegicus*) fajokat használtunk. Élő állaton nem végeztünk kísérletet, vizsgálataink izolált sejteken vagy szövetkivonatokkal történtek. A kísérletekre érvényes engedéllyel rendelkezünk az adott időszakban megfelelő hivataloktól. Az állatokat szakképzett személyzet gondozta az erre kialakított korszerű állatházi körülmények között. Az egerekből agyi citoszol preparátumot nyertünk vagy hátsó gyöki ganglion neuronokat izoláltunk elektrofiziológiai mérésekhez. Patkányokból mellékvesekéreg glomerulóza szövetet vagy sejteket izoláltunk. Az afrikai karmosbékák petesejtjeit expressziós rendszerként használtuk, amelyben a legtöbb mérést végeztük és következtetéseinket főként ezekre az eredményekre alapoztuk. Az ovárium lebenyek kollagenázos emésztése után a *Xenopus* petesejteket preparációs mikroszkóp alatt manuálisan defollikuláltuk. Az oocytákat 50 nl megfelelő cRNS oldattal Nanoliter Injector (World Precision Instruments) berendezéssel mikroinjektáltuk és az áramokat három vagy négy nappal az injektálás után mértük.

3.3 Elektrofiziológia

3.3.1 Két elektródos feszültségzár (voltage clamp) mérések

A teljes petesejt plazmamembránon keresztül folyó áramokat két elektródos voltage clamp erősítő (OC-725C, Warner Instrument) segítségével mértük. A mikroelektródokat boroszilikát üvegből P-87 pipettahúzó berendezéssel (Sutter Instruments) készítettük úgy, hogy ellenállásuk 3 M KCl feltöltés után 0.3 és 1 MΩ között legyen. Digidata 1200 vagy 1440A (Axon Instruments) AD/DA konverter segítségével vezéreltük az erősítőt és digitalizáltuk a mért adatokat. A mérőapparátus szoftveres irányítását és az adatok kezdeti kiértékelését a pCLAMP 6 vagy 10 programcsomagokkal valósítottuk meg. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük és az oldatokat egyszerű, a gravitációt kihasználó, polietilén vagy teflon csövekből épített perfúziós rendszer segítségével juttattuk a mérőkamrába. A K_{2P} csatornák áramát rutinszerűen -100 mV membránpotenciálra mértük magas kálium koncentrációjú EC oldatban, ebből

az alacsony kálium koncentrációjú oldatban jelentkező kis nem specifikus csurgó (leak) áram amplitúdóját levontuk. Az alacsony K^+ koncentrációjú oldat összetétele a következő volt: 95.4 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 5 mM HEPES (pH 7.5, NaOH). Ehhez képest, a magas, 80 mM K^+ koncentrációjú oldatban a Na^+ koncentrációt megfelelően (-78 mM) csökkentettük. Egyes mérések közben egy harmadik mikrokapillárison keresztül intracellulárisan injektáltunk hatóanyagot, illetve esetenként egyazon sejten kétszer mértük az áramokat a mikroinjektálás vagy hosszú időtartamú kezelés előtt és után.

3.3.2 Teljes sejt, kivágott folt és egyedi csatornás patch clamp mérések

A patch clamp méréseket Axopatch 1-D (Axon Instruments) erősítővel végeztük. A teljes sejt (pl. HEK-293 vagy COS-7 sejt vonal vagy izolált hátsó gyöki ganglion neuronok) mérésénél a jellemző pipetta ellenállások 3 és 6 M Ω között voltak. A mikrokapillárist intracelluláris jellegű, közel izoozmotikus pipettaoldattal töltöttük fel (pl. 135 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 2 mM Na_2ATP , 10 mM HEPES (pH 7.3, NaOH)). A pipettahegy és a plazmamembrán között kialakuló szoros kapcsolat (seal) ellenállása méréseinkben meghaladta az 5-10 G Ω értéket. Az adatokat Digidata 1200 interfésszel mintavételeztük és pCLAMP 6 vagy 10 szoftverrel regisztráltuk. Egyes mérésekben a csatornák áramát és gátlószer érzékenységét kivágott membránfoltban (excised patch) regisztráltuk, a membrán belsejét kifordított (inside-out) vagy külsejét kifordított (outside-out) módban. Az egyedi csatornás mérésünkben különösen nagy ellenállású (30-80 M Ω) pipettákat használtunk, melyek kapacitását R-6101 elasztomer (Dow Corning) bevonattal csökkentettük. A rendkívül kicsiny membránfoltokat nagyon magas TRESK expressziójú petesejtek (40-120 μA teljes sejt áram) membránjából vágtuk ki, hiperozmotikus DL-aszpartátos zsugorítást és manuális devitellinizálást követően. A magas seal ellenállás (>40 G Ω) mellett a regisztrátum aránylag magas frekvencián történő szűrése (2 kHz) és mintavételezése (10 kHz) tette lehetővé az alacsony (≈ 13 pS) vezetőképességű és rövid nyitvatartási idejű TRESK csatorna aszimmetrikus kapuzási tulajdonságának felismerését.

3.4 Fehérjével végzett kísérletek

3.4.1 Rekombináns fehérjék termelése *E. coli* expressziós rendszerben

Kísérleteinkben többféle okból is szükségünk volt működőképes fehérjékre, aktív enzimekre. *Xenopus* petesejtbe mikroinjektálva vizsgáltuk a fehérjék (pl. kalcineurin, MARK2 vagy 14-3-3) hatását a TRESK csatornára. Rekombináns immobilizált csalifehérjékkal halásztunk interakciós partnereket citoszolból. A TRESK foszforilációt radioaktív ^{32}P jelöléssel *in vitro* kináz és foszfatáz reakciókkal igazoltuk. Egyes reakcióknál nem csak az aktív enzimet (pl. His₆-MARK2-T208E), hanem a különböző szerinek kombinációját tartalmazó (TRESK intracelluláris

régióinak megfelelő) szubsztrátot is előállítottuk. Habár a legtöbb fehérjetisztítási megközelítésünk alapjául a standard GST/glutation-agaróz és a His₆/Ni-NTA-agaróz affinitás kromatográfiás rendszerek szolgáltak, az egyes fehérjék termeltetésére és tisztítására lényegesen eltérő eljárásokat kellett beállítanunk. Pl. a TRESKloop-His₈ intracelluláris hurok régióinak megfelelő fehérjerészleteket denaturáló körülmények között (7 M urea jelenlétében) inklúziós testekből tisztítottuk. Ezzel szemben a 14-3-3 és MARK2 konstrukciók jól termelődtek natív állapotban és 50 % glicerinnel oldatban, dializálva, -20 °C-on tartósan működőképesek maradtak. A mirisztoilált konstitutív aktív kalcineurin heterodimer (His₆-CnA(1-398)+B) termeltetéséhez az *E.coli* baktériumokat az általunk előállított, csonkolt A és teljes B foszfatáz alegységeket kódoló bicisztronos és a mirisztoil-transzferáz cDNS-t tartalmazó plazmidokkal kotranszformáltuk.

3.4.2 Interakciós partnerek azonosítása immobilizált csali fehérjékkel

A TRESK csatorna intracelluláris hurok régiójának különböző változatait kiterjedten használtuk fehérje-fehérje interakció kimutatására ("pull down" kísérletek). A rezinen GST- vagy His₈ fúziós fehérjeként immobilizált csatorna darabhoz oldatban hozzáadtuk a feltételezett interakciós partnert (pl. kalcineurin, 14-3-3, tubulin), majd megfelelő mosási lépések után a kötődő fehérjét eluáltuk (SDS mintapufferrel vagy 7 M ureával). Kontrollként, ha lehetséges volt, a csalifehérje feltételezett kötőmotívumának mutáns változatával igazoltuk a specifikus kötés hiányát. Ez a megközelítés elég specifikus volt ahhoz is, hogy az immobilizált csalifehérjével egér agy citoszolból is kihalásszuk az interakciós partnert megfelelő körülmények között (pl. a 14-3-3 kötéshez a csalifehérjét foszforilálni kellett PKA-val).

3.4.3 Kináz és foszfatáz reakciók immobilizált szubsztrát fehérjékkel

Olyan immobilizált TRESK fehérjerészletekkel, amelyekben a szerin és treonin aminosavakat alaninra cseréltük, lehetővé vált az egyes pozíciók foszforilációjának elkülönített vizsgálata. Pl. egy olyan szubsztrátfehérjével vizsgáltuk a TRESK csatornaaktivitás szabályozásában fontos szerinek foszforilációját *in vitro*, amelyben csak a három célpont szerin volt megtartott, de a vad típusú csatorna hurok további hét szerin és egy treonin aminosavát mutáltuk. A szabályozásban fontos szerineket foszforiláló MARK kináz azonosítása után vizsgálni tudtuk a foszfatáz reakció kinetikáját is, ha előzőleg a célpont szerineket radioaktívan jelöltük ³²P-γ-ATP jelenlétében a kinázzal.

4. A TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

4.1 A TRESK és Kv8.2 K⁺ csatorna klónozása, alapvető elektrofiziológiai és farmakológiai tulajdonságaik meghatározása

Egy saját fejlesztésű számítógép programmal két új, korábban ismeretlen kálium csatorna gént azonosítottam a 2000-es évek elején még nem annotált humán genom szekvenciájában. A humán TRESK kódoló régiót genomialis DNS-ből sokszorosított exonokból építettük össze, az egér TRESK cDNS-t RT-PCR módszerrel kisagyból amplifikáltuk. A Kv8.2 feszültségfüggő K⁺ csatorna alegység kódoló szekvenciát a BG342392 EST klónból és az egér szem totál RNS-ből RT-PCR módszerrel sokszorosított termékből építettük össze.

Kimutattuk, hogy a Kv8.2 nagy mennyiségben kifejeződik a retina fotoreceptor sejtekben és a Kv2.1 alegységgel olyan heteromer csatornát alkot, amelynek különleges elektrofiziológiai tulajdonságai lehetővé teszik a fényre adott membránpotenciál változás finomhangolását. Elsőként vetettük fel, hogy a Kv2.1/Kv8.2 csatorna, a fotoreceptorokban évtizedekkel korábban leírt, I_{Kx} áram molekuláris megfelelője.

Meghatároztuk a TRESK makroszkópos és egyedi csatorna áram alapvető tulajdonságait. A humán vagy egér TRESK cRNS-sel mikroinjektált *Xenopus* petesejtekben jellegzetes háttér K⁺ áram jelenik meg, amelynek amplitúdója több nagyságrenddel meghaladja az oocyta endogén K⁺ áramának nagyságát, -100 mV-on mérve, magas (80 mM) EC [K⁺]-ban. Az áram nem mutat jelentős feszültségfüggő aktivációt, deaktivációt vagy inaktivációt. Hasonló tulajdonságú áram megjelenik emlős sejtvonalon (HEK-293 vagy COS-7) expressziós rendszerekben is a megfelelő TRESK-et kódoló plazmid tranziens transzfekcióját követően. Az áram nem vagy aránylag kevésbé érzékeny a klasszikus K⁺ csatorna gátlószerekre (pl. TEA vagy 4-AP, 3 mM). Az extracelluláris Ba²⁺ (300 μM) azonban jellegzetes feszültségfüggő gátlást okoz, mint az a K_{2P} csatornákra és számos egyéb K⁺ csatorna típusra egyaránt jellemző. A *Xenopus* petesejt membrán kivágott foltban vizsgált egyedi csatorna aktivitás jellegzetes aszimmetrikus kapuzási tulajdonságot mutat, amely a K_{2P} csatornák között kivételes. A befelé irányuló elemi áram (140 mM EC és IC [K⁺]-ban) rendkívül rövid, akár szubmiliszekundumos megnyílások sorozatait (burst) mutatja. A kifelé irányuló áramot azonban négyszögjelszerű megnyílások jellemzik, amelyekből a vezetőképeség (≈13 pS) könnyebben meghatározható.

4.2 A különböző G-fehérjékhez kapcsolt receptorok TRESK csatornára kifejtett hatásának vizsgálata

A TRESK csatornát M₁ muszkarinos acetilkolin receptorral koexpresszáló oocytákban a receptor agonista karbachol (1 μM) a háttér K⁺ áram nagyfokú (kb.

tízszeres) aktivációját eredményezi. A szintén G_q -fehérje kapcsolt AT_{1a} angiotenzin receptor koexpresszióját követően az angiotenzin II (10 nM) hasonló aktiváló hatást fejt ki a TRESK áramra. Elsőként mutattuk ki azt is, hogy a csak TRESK csatorna cRNS-sel injektált petesejteken az endogén lizofoszfaditsav (LPA) receptorok ingerlése (0.5 μ M LPA) szintén erőteljesen aktiválja a háttér K^+ áramot. Ez utóbbi megfigyelés példa arra, hogy a TRESK aktiváció nem csak overexpresszált receptorok esetén váltható ki, hanem ehhez a receptor normális szintű kifejeződése is elegendő. Mivel a *Xenopus* petesejt LPA receptorairól ismert, hogy aktiválják a G_q -fehérje jelpályát, ezért eredményeink egybehangzóan támogatják a következtetést, miszerint a G_q -fehérje által elindított jelátvitel felelős a TRESK áram aktiválódásáért. A TRESK csatornát M_2 muszkarinos acetilkolin receptorral koexpresszálna a karbachol K^+ áramot fokozó hatása nem jelentkezett, vagyis a G_i -fehérjéhez kapcsolt receptor ingerlése nem aktiválta a TRESK csatornát.

4.3 A G_q -fehérjéhez kapcsolt receptorok erőteljes TRESK aktiváló hatását közvetítő mechanizmus felderítése

A G_q -fehérje szerepét tekintetbe véve, kézenfekvőnek tűnt megvizsgálunk a citoplazma $[Ca^{2+}]$ emelkedésének hatását a TRESK áramra. Ugyanakkor egyben meglepő volt a kalcium-függő szabályozás hipotézise, hiszen a korábban sikeresen kifejezett egyéb K_{2P} csatornák áramát a kalcium jel nem befolyásolta. Természetesen ismertek voltak a kalcium-függő K^+ csatornák, amelyeket a Ca^{2+} ion csatornaféhrje-komplexhez kötődése aktivál, azonban ezek más K^+ csatorna családba tartoznak, nem a 4TMS/2P szerkezetű háttér K^+ csatornák közé.

Ha a két elektródos voltage clamp mérés közben a két mérőelektród mellett egy harmadik mikrokapillárison keresztül inozitol-1,4,5-triszfoszfátot (IP_3 , 10 ng) injektáltunk a citoplazmába, akkor ennek hatására a TRESK áram körülbelül 10-szeresére nőtt. Tehát a Ca^{2+} felszabadítása az intracelluláris raktárból az IP_3 -receptoron keresztül kiváltotta a TRESK aktiválódását. Ha viszont az intracelluláris Ca^{2+} raktárt kiürítettük tartós thapsigargin (SERCA inhibitor, 1 μ M, 5-6 h) előkezeléssel, akkor az ezt követő G_q kapcsolt receptor ingerlés TRESK aktiváló hatása elmaradt. Mindemellett, a TRESK K^+ áramot a kalcium ionofór ionomycin (0.5 μ M) alkalmazása is többszörösére növelte. Ezek az eredmények igazolták, hogy a TRESK csatornát a citoplazma $[Ca^{2+}]$ növekedése aktiválja.

Megkísérletük a Ca^{2+} hatásának közvetlen kimutatását is. A sejtbe magas (5 mM) kalcium koncentrációjú oldatot injektálva azonban érdekes módon nem jött létre TRESK aktiválódás, vélhetően a Ca^{2+} nem jutott el a hatás helyére. Ezért a következőkben 50 mM Ca^{2+} -EGTA komplexet alkalmaztunk, amelynek injektálása erősen aktiválta a TRESK áramot. A Ca^{2+} -mal telített EGTA nem kötődik a citoplazma kalcium-kötő fehérjéihez és a pumpamechanizmusok sem távolítják el. A hatás helyére

diffundálva disszociálja a Ca^{2+} -ot, amely mikromólos koncentrációban a hatást kifejti. A kalcium-mentes EGTA kelátor injektálása viszont kivédte a receptor-mediált TRESK aktivációt. Ezek a kísérletek egyértelműen igazolták, hogy a citoplazma $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedése a TRESK csatorna aktiválódás szükséges és elégséges feltétele.

4.4 A TRESK kalcium-függő szabályozásának vizsgálata. Közvetlenül a csatornához kötődve fejt ki a hatását a Ca^{2+} ion, vagy közvetett úton?

Belső oldalt kifordított (inside-out) módú kivágott membrán foltokban (excised patch) vizsgáltuk a TRESK egyedi csatorna (single channel) aktivitást, miközben a kalcium-mentes (intracellulárisnak megfelelő) oldatot $10 \mu\text{M}$ szabad kalcium koncentrációjú kalcium pufferre cseréltük. A $[\text{Ca}^{2+}]$ növelésére a TRESK aktivitás nem változott. Ebből az következik, hogy a Ca^{2+} ion nem közvetlen kötődéssel szabályozza a TRESK csatornát, hanem az aktivációhoz szükséges valamilyen egyéb faktor, amely a sejtmentes kivágott folt mérési felállásban, a citoplazma elmosását követően, már nem állt rendelkezésre. Vagyis a TRESK kalcium-függő aktivációja lényegesen különbözik a klasszikus kalcium-aktivált K^+ csatornák szabályozásától.

A kalcium/kalmodulin-függő protein foszfatáz kalcineurin specifikus gátlószerei, a ciklosporin A (100 nM) és az FK506 (tacrolimus, 200 nM) kivédtek a TRESK aktivációt. Ez erősen valószínűsítette, hogy a kalcineurin szerepet játszik a csatorna aktivitás szabályozásában. Hogy ezt a következtetést farmakológiai megközelítéstől független módszerrel is igazoljuk, a konstitutívan aktív kalcineurin heterodimert koexpresszáltuk a TRESK csatornával. A kalcineurin katalitikus A alegységének C-terminális autoinhibitoros doménjét deletáltuk, ezáltal az enzim a citoplazma $[\text{Ca}^{2+}]$ szintjétől függetlenül aktívvá vált. A csonkolt A és teljes hosszúságú B kalcineurin alegységek koexpressziója a csatornával megnövelte a TRESK áramot. Emellett a háttér K^+ áram arányában kisebb mértékben aktiválódott tovább citoplazma $[\text{Ca}^{2+}]$ növelés (ionomycin) hatására, hiszen a TRESK csatornák jelentős hányada már alaphelyzetben is aktivált (defoszforilált) volt. Az alapáram növekedése és az ionomycinre adott relatív válasz csökkenése nem jelent meg, ha a TRESK-et a teljes hosszúságú, vad típusú A és B kalcineurin alegységekkel koexpresszáltuk, hiszen ilyenkor az enzim kalcium iránti érzékenysége megtartott volt. A TRESK csatornát szintén aktiválta, ha az *E.coli*-ban termeltetett rekombináns konstitutívan aktív kalcineurin enzimet mikroinjektáltuk a petesejtbe. A farmakológiai és molekuláris biológiai megközelítések egymást erősítő bizonyították, hogy a TRESK aktivációért a kalcineurin foszfatáz felelős.

4.5 A kalcium/kalmodulin-függő protein foszfatáz kalcineurin által defoszforilált, TRESK szabályozásban fontos, aminosav oldalláncok azonosítása

Az ionszatornák foszforilációs szabályozása sokszor igen összetett, esetenként akár több csatorna alegységet vagy interakciós fehérjét is érintő folyamat. Kíváncsiak

voltunk, hogy vajon a TRESK csatornát a kalcineurin közvetlenül defoszforilálja, vagy a hatás kizárólag közvetett úton valósul meg. A lehetséges direkt szabályozási pontokat próbáltuk megkeresni a csatorna aminosav szekvenciájában. Úgy gondolkodtunk, hogy ha az egyik szerin vagy treonin aminosav foszforilációja fontos a csatorna aktivitásának szabályozásában és a kalcineurin ennek defoszforilációjával aktivál, akkor az adott aminosav alaninra cserélése konstitutívan aktív csatornát kell hogy eredményezzen. Nyilván a mutált pozícióban a csatorna gátló foszforilációja nem jöhet létre. Ezért az egér TRESK csatorna minden intracelluláris szerin vagy treonin aminosavát egyesével vagy kettes-hármas csoportokban alaninra cseréltük. Később számos ilyen mutáció hatását a humán TRESK csatornában is vizsgáltuk. Logikusan azt várhatjuk, hogy a csatorna alapárama megnő, az ionomycinre adott relatív aktiváció mértéke pedig csökken, ha mutációval eltalálunk egy fontos szabályozási pontot. Természetesen ezzel a megközelítéssel a szabályozási pontok csak valószínűsíthetők, hiszen a mutáció befolyásolhatja a csatorna expresszió mértékét is és ezen keresztül az alapáramot, vagy pedig károsíthatja a csatorna aktivációs mechanizmusát a foszforilációtól függetlenül. Mindenesetre, azok a szerinek, amelyeknek mutációja nem befolyásolja sem az alapáramot, sem az ionomycinre adott választ, valószínűleg nem vesznek részt a csatorna szabályozásában *Xenopus* petesejtben.

Az alanin pásztázó mutagenézis négy aminosav pozícióra hívta fel a figyelmünket a TRESK szekvenciájában. A legkifejezettebb hatást az S276 (humán csatornában S264) aminosav esetében kaptuk, amelynek mutációja minden előre elvárt feltételt teljesített. Alapárama a vad típusú csatornáénak négyszerese volt, ionomycinre pedig nem aktiválódott. Ha ugyanebben a pozícióban a szerint glutamáttal vagy aszpartáttal helyettesítettük, akkor az ionomycinre adott válasz jóval elmaradt a vad típusétól (kb. 2-szeres aktiváció), azonban az alapáram nem növekedett. Ez azt sugallta, hogy az alanin mutáns konstitutívan aktív csatorna, míg a szerin negatív töltésű aminosavval helyettesítése a foszforilációt utánozza és gátolt, nem aktiválható állapotnak felel meg.

A fent említett pozíciót kettővel megelőző szerin (egérben S274, humán TRESK-ben S262) mutációja alaninra szintén kivédte az ionomycin hatását, azonban a mutáns alapárama nem különbözött szignifikánsan a vad típusétól. Ezek alapján ennek az aminosavnak a szerepe is felmerül a szabályozásban. A feltételezett valószínű szabályozási pontokhoz közel helyezkedik el az S279 (humán csatornában S267) aminosav, amelynek a mutációja nem változtatta az alapáramot és csak tendenciájában csökkentette az ionomycinre adott választ. Az így azonosított három szerin együtt alkotja az egyik fő szabályozó régiót, amelyet a továbbiakban szerin klaszter néven említünk (egérben S274,276,279; humán TRESK-ben S262,264,267).

A szerin klaszteren kívül volt még egy aminosav, amelynek a mutációja szignifikánsan csökkentette az ionomycinre adott választ, sőt tendenciájában az alapáramot is növelte kissé (ez utóbbi hatás nem volt szignifikáns). Ez a szerin az egér

csatornában a 264-es, a humán TRESK-ben a 252-es (aláhúzott) pozícióban található az erősen konzervált RSNSCPE szekvenciában. Ennek a szerinnek a glutamátra cserélése is kivédte az ionomycinre adott választ, azonban az alapáramot tendenciájában (nem szignifikáns módon) csökkentette.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy az alanin pásztázó mutagenézis az RSNSCPE szerinjét és a szerin klasztert azonosította, mint a szabályozó foszforiláció lehetséges célpontjait. A többi intracelluláris szerin és treonin mutációja nem befolyásolta az alapáramot és az ionomycinre adott választ.

4.6 A TRESK csatorna és a kalcineurin fehérje-fehérje interakciójának vizsgálata

Minden biokémiai kísérletet megelőzően egy heurisztikus megközelítés vezetett a TRESK csatorna és a kalcineurin közötti közvetlen fehérje-fehérje interakció felismeréséhez. Habár ezt semmilyen motívumkereső szoftver nem jelezte, a TRESK csatorna PQIVID (egér), illetve PQIIS (humán) szekvenciáról megsejtettem, hogy az megfelelhet a kalcineurin legismertebb szubsztrátjában, az NFAT transzkripciós faktorban leírt PxlIT kalcineurin-kötő konszenzus motívumnak. A hipotézis első vizsgálatához mutációkat terveztem a feltételezett kötőhely kiiktatására. A PQIVIA, PQIVAD és PQAVAD mutációk a felsorolt, a mutáció súlyosságának megfelelő sorrendben csökkentették az egér TRESK csatorna kalcium-függő aktivációját. A PQAVAD mutáns egyáltalán nem aktiválódott ionomycin (0.5 μM), M_1 receptoron keresztüli karbachol (1 μM) ingerlés vagy intracellulárisan mikroinjektált 50 mM szaturált Ca^{2+} -EGTA puffer (50 nl) hatására. A megsejtett motívum mutációja tehát megakadályozta a kalcineurin közvetlen kötődését a TRESK csatorna intracelluláris hurok régiójához és ezáltal teljes mértékben kivédte a kalcium-függő defoszforilációs csatorna aktiválási mechanizmust.

A mutációs megközelítéstől független módon is megerősítettük a következtetést. A mások által leírt mesterséges PVIVIT szekvenciát tartalmazó peptid rendkívül nagy affinitással kötődik a kalcineurin NFAT-kötő régiójához, ezért alkalmas a kalcineurin-NFAT interakció megakadályozására. A peptid mikroinjektálása (10 mM, 50 nl) az egér TRESK-et kifejező petesejtekbe teljesen kivédte az ionomycin hatását, a háttér K^+ áram egyáltalán nem aktiválódott. A kalcineurin NFAT-kötő zsebének telítése a peptiddel leszorította a kalcineurint TRESK csatornáról és ezzel elejét vette a csatorna defoszforilációjának.

A közvetlen fehérje-fehérje interakciót *in vitro* is kimutattuk. Az immobilizált GST-TRESK-hurok fehérje kötötte az *E. coli*-ban termeltetett konstitutívan aktív kalcineurin heterodimert ($\text{His}_6\text{-CnA}(1\text{-}398)\text{+B}$). A kötést a TRESK hurok régió PQAVAD mutációja, illetve a PVIVIT peptid (200 μM) kivédte. A vad típusú PQIVID szekvenciát tartalmazó csalifehérje kötötte a szarvasmarha agyból tisztított natív kalcineurint is, azonban csak

akkor, ha a reakcióhoz kalciumot és kalmodulint adtunk. A VIVIT peptid (200 μ M) ez utóbbi kötődést is megakadályozta.

A humán TRESK csatorna kalcineurin-kötő motívumának mutációs analízise meglepő eredményt hozott. Eltérően az egér csatornától, a PQIIS szekvencia roncsolása nem szüntette meg teljesen a kalcium-függő TRESK aktivációt. A PQAAAS mutáns még mindig 2.4-szeresére aktiválódott ionomycin hatására. (Azonos körülmények között a vad típusú csatorna árama 11-szeresére növekedett.) Emiatt felmerült a lehetőség, hogy a humán csatorna a PQIIS motívumon kívül egy másik kalcineurin-kötő régiót is tartalmaz. Váratlan fordulatként újra a kalcineurin-NFAT interakció irodalma segített a továbblépésben. Az NFAT-ben ugyanis leírtak egy másik kalcineurin-kötő motívumot is, amelyre az LxVP konszenzus szekvencia jellemző. Ilyen szekvenciát nem találtunk a humán TRESK csatornában, azonban az ehhez hasonló intracelluláris aminosav négyesek mutációs analízisét elvégeztük. Az LQLP szekvencia AQAP mutációja, a PQAAAS mutációval kombinálva, teljesen kivédte a humán TRESK ionomycinre adott válaszát. Habár az LQLP szekvencia nem felelt meg tökéletesen a korábban leírt LxVP konszenzus motívumnak, további kísérleteinkkel igazoltuk, hogy valódi kalcineurin-kötő régiót képez.

A mindkét (PQIIS és LQLP) kalcineurin-kötő régiót tartalmazó, glutation-agarózon immobilizált GST-TRESK-hurok(174-280) csalifehérje kötési tulajdonságát egér agy citoszol felhasználásával vizsgáltuk ("pull down" kísérletben). A baktériumból tisztított foszforilálatlan rekombináns csalifehérje két interakciós fehérjét kötött nagy mennyiségben a citoszolból, amelyek SDS-PAGE gélen Coomassie kék festéssel is kimutathatók voltak. A tubulint és a kalcineurint (ld. alább az interakciós partnerek fejezetben), amelyeket ebben a kísérletben specifikus antitestekkel Western blot módszerrel is azonosítottunk. A kalcineurin kötése kalcium-függő volt (a citoszol tartalmazta a szintén szükséges kalmodulint), kalcium-mentes körülmények között sokkal kevésbé jött létre. A csalifehérje AQAP mutáns változata szignifikánsan kevésbé kötötte a kalcineurint (kalcium jelenlétében), mint az LQLP szekvenciát tartalmazó. Tehát a híg citoszol preparátumból a kalcineurin hatékony kötéséhez mindkét kötőhely szükséges volt és az LQLP mutációja esetén a PQIIS csak kisebb mértékű kötést tett lehetővé. Az LQLP régió kalcineurin kötését akkor is ki tudtuk mutatni hasonló kísérletben, ha a rövidebb GST-TRESK-hurok(232-280) csalifehérjét alkalmaztuk, amely nem tartalmazta a PQIIS helyet. Az LQLP régió önálló kalcineurin-kötése jóval gyengébb volt, mint a mindkét kötőhelyet tartalmazó konstrukcióé és csak kalcium jelenlétében volt kimutatható. A PVIVIT szekvenciát tartalmazó peptid nem befolyásolta a kalcineurin kötődését az LQLP régióhoz.

Kíváncsiak voltunk, mi lehet az LQLP régió funkcionális jelentősége. Ezért megvizsgáltuk az AQAP (és AQLP) mutáns humán TRESK csatorna kalcium-függő szabályozását. A nagy kalcium jelre (500 nM ionomycin, vagy 1000 nM karbachol) adott

áram növekedés mértékét nem befolyásolta a mutáció, de az aktiválódást kissé lelassította. A kis kalcium jelre (50-200 nM ionomycin vagy 1-30 nM karbachol emelkedő koncentráció sorozatra) adott válasz azonban jelentősen kisebb volt az AQAP mutáns esetén, mint az LQLP vad típusnál. Az LQLP motívum tehát meghatározó szerepet játszik a humán TRESK csatorna szabályozás megfelelő kalcium-érzékenységének kialakításában, az alapvető fontosságú PQIIS-kalcineurin interakció mellett.

4.7 Kináz enzim(ek) azonosítása, amelyek a kalcineurin célpont szereket foszforilálják és ezáltal a TRESK csatornát gátolják

Ha a kalcineurin defoszforilálja a 3.5 pontban bemutatott szerin aminosavakat és ezáltal aktiválja a TRESK csatornát, akkor ugyanezen pozíciók foszforilációja csökkenti a K^+ áram nagyságát. Ezért olyan kináz enzime(ke)t kerestünk, amelyek az RSN \underline{S} CPE szerint és a szerin klasztert foszforilálni képesek. Nagyon kíváncsiak voltunk, hogy ezek tényleg kifejtenek-e TRESK gátló hatást.

Az RSN \underline{S} CPE szerint a protein kináz A foszforilálja. Ezt az egér TRESK csatorna S276E mutáns változatán mutattuk ki. Ebben a mutánsban a szerin klaszter működését akadályoztuk a mutációval, tehát a csatorna szabályozása főként a másik (RSN \underline{S} CPE) régiótól függött. Az ionomycinnel előidézett csatorna aktivációt követően forskolint (50 μ M) és IBMX-et (1 mM) adtunk, ezzel növelve a cAMP koncentrációt a petesejtben. A PKA aktivációja meggyorsította a K^+ áram visszatérését a nyugalmi gátolt állapotba, összhangban a csatorna gyorsabb gátló foszforilációjával. Az S264E (RSN \underline{E} CPE) mutáns csatornánál az áramvisszaállítás gyorsító hatás nem volt kimutatható. Az S276E mutánsnál a forskolin+IBMX kezeléshez hasonló eredményt kaptunk cAMP mikroinjektálásával is.

Előállítottuk a TRESK-hurok-His $_8$ fúziós fehérje egy olyan változatát, amelyben az S264 szerinen (RAN \underline{S} CPE) kívül minden egyéb szerint és treonint alaninra cseréltünk. A PKA *in vitro* foszforilálta ezt a fehérjét 32 P- γ -ATP jelenlétében, amit a radioaktív foszfátcsoport beépülése jelzett. Ezzel szöges ellentétben, azt a TRESK-hurok-His $_8$ fúziós fehérje változatot, amelyben csak a szerin klaszter aminosavai voltak megtartottak (minden mást, beleértve az S264-et is, alaninra cseréltünk), a PKA egyáltalán nem foszforilálta azonos körülmények között. Összegezve tehát a PKA foszforilálja a RSN \underline{S} CPE szerint, de a szerin klaszter elemeit nem.

Mivel a szerin klaszter tűnik a TRESK aktivitás legjelentősebb foszforilációs szabályozási pontjának, hat éven keresztül próbáltam olyan kinázt találni, amelynek ez a régió szubsztrátja. Több mint 20 féle szerin-treonin kináz cDNS-ét klónoztuk meg, ezek többségének konstitutívan aktív mutáns változatát is előállítottuk. Ezek közül azonban egyik kináz koexpressziója sem okozott észrevehető hatást a TRESK kalcium-függő szabályozására. Végül erőfeszítésünket siker koronázta, és azonosítottuk a

mikrotubulus-asszociált fehérje affinitás reguláló kinázt (MARK). Ez a kináz gátolja a TRESK bazális áramát, akár 30-szorosra növeli az ionomycinnel kiváltható relatív aktivációt és drámai módon felgyorsítja a K^+ áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően. Mindemellett az *E.coli*-ban termeltetett konstitutívan aktív His₆-MARK2-T208E petesejtbe mikroinjektálva hasonló hatást eredményez, mint a kináz koexpressziója, és az enzim *in vitro* foszforilálja a szerin klasztert. Ezek alapján bizton állítható, hogy a MARK közvetlenül foszforilálja a TRESK szerin klaszter régiót és ezáltal gátolja a csatorna aktivitást.

4.8 További TRESK interakciós fehérje partnerek keresése. A 14-3-3 állványfehérje TRESK szabályozásban betöltött szerepének vizsgálata

A GST-TRESK-hurok és TRESK-hurok-His₈ fúziós csalifehérjékkel végzett halászás egér agy citoszolból három partnerfehérjét eredményezett, amelyeket triptikus peptid tömegspektrometriával azonosítottunk. A kalcineurin katalitikus A alegységen kívül kijöttek különböző tubulin alegységek (α 1B vagy α 1C, β 3 és β 4A) és a csalifehérje PKA-val foszforilálva nagy mennyiségben kötött 14-3-3 adapter fehérje izoformákat (γ , ϵ és ζ). A tubulin kötés funkcionális jelentősége mind a mai napig tisztázatlan, azonban a TRESK hurok régióin belül leszűkítettük, hogy a kötéshez elégséges a LVLGRLSY₅₁IISNLDE szekvencia, amelyben az aláhúzott aminosavak a szerin klaszternek felelnek meg.

A 14-3-3 overexpresszió, vagy a domináns-negatív (R57,61A) 14-3-3, csakúgy mint a 14-3-3 kötőhely telítése pS-Raf259 foszfopeptid mikroinjektálással, egyértelműen befolyásolja a TRESK kalcium-függő szabályozását, azonban az interakció meglehetősen összetett. A legegyszerűbb hatás, hogy a 14-3-3 gátolja a TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktiváció után. Ennek valószínű oka a szerin klasztert foszforiláló kináz 14-3-3-függő gátlása. (Igazából ez a megfigyelés vezetett az ismert módon 14-3-3 által gátolt MARK kináz kipróbálásához.) Jelenleg úgy gondoljuk, hogy ez a hatás független attól, hogy a 14-3-3 közvetlenül, foszforiláció-függő módon kötődik a TRESK RSN₅CPE régiójához, amely egy szabályos "mode I" 14-3-3 kötőhelyet alkot. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a PKA által foszforilált TRESK közvetlen 14-3-3 kötése gátolja a csatorna aktivitást.

4.9 Az új (novel) típusú protein kináz C (PKC) a TRESK csatornát a szerin klaszter közvetett defoszforilációján keresztül aktiválja

Rahm A.K. és mtsai. leírták, hogy a protein kináz C (PKC) aktivátor PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, 100 nM) a humán TRESK csatorna áramának többszörös aktivációját hozza létre 30 perc alatt *Xenopus* petesejtben. A konvencionális PKC izoformákra specifikus aktivátor thymeleatoxin (TMX, 100 nM, 30 min) viszont egyáltalán nem befolyásolta a K^+ áramot. A humán TRESK csatornában található nyolc PKC foszforilációs konszenzus szekvencia mutációi nem változtatták meg a PMA

hatására létrejövő TRESK aktivációt, ami valószínűsíti, hogy az aktivációt nem a csatorna közvetlen PKC-függő foszforilációja hozza létre.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy nem a kalcineurin közvetíti a PKC hatását a TRESK csatornára. A PMA a vad típusú csatornával megegyező mértékben aktiválja a PQAAAAS-AQAP mutáns TRESK-et is, amely nem tud kalcineurint kötni. Emellett a citoplazma kalcium koncentrációjának alacsony szinten rögzítése EGTA kelátor mikroinjektálásával szintén nem befolyásolja a PKC-függő TRESK aktivációt, pedig az ionomycin hatását teljesen kivédi.

Habár a kalcineurin nem vesz részt a PKC-függő TRESK aktiváció közvetítésében, az egyik kalcineurin célpont szerin mutációi (S264A és S264E) teljesen kivédtek a PMA hatását. A szerin klaszter foszforilált állapotának stabilizálása egy megfelelő csonkolt MARK kináz konstrukció overexpressziójával hasonlóan kivédte a PKC-függő TRESK aktivációt. Ez arra utal, hogy a PMA hatását a szerin klaszter defoszforiláció közvetíti. A PMA adása vagy a PKC η vagy PKC ϵ koexpressziója a TRESK csatornával lassította a K⁺ áram visszatérést a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően. A PKC-függő TRESK aktiváció valószínű mechanizmusa tehát az, hogy a protein kináz C gátolja azt a kinázt, amely a szerin klaszter foszforilációjáért felelős és ezért a csatornák idővel felhalmozódnak a defoszforilált állapotban.

4.10 A TRESK csatornát gátló farmakológiai ágensek azonosítása

A helyi érzéstelenítő benzokainról (1 mM) kimutattuk, hogy jobban gátolja a kalcineurinnal aktivált TRESK csatornát (51 % gátlás), mint a nyugalmi állapotút (13 %). Az állapotfüggő gátló hatás heterolog rendszerben értékelhető, hiszen a benzokain nem szelektív gátlószer. A laboratóriumunkban fellelhető 240 anyag szűrésével kimutattuk, hogy a Hg²⁺ ion 1 μ M alatti IC₅₀ értékkel gátolja a humán és eger TRESK csatornát. A Hg²⁺ hat kivágott membránfoltban is, hatása valószínűleg közvetlenül a csatornán érvényesül. A Hg²⁺ az egyéb K_{2P} csatornákat kevésbé befolyásolja, vagy aktiválja.

5. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. A humán genom szekvenciájában azonosítottuk a TRESK (KCNK18) és Kv8.2 (KCNV2) géneket, majd a csatorna alegységek cDNS-ét megklónoztuk. Elsőként igazoltuk, hogy a Kv8.2 a retina fotoreceptor sejtjeiben kifejeződik és a Kv2.1 alegységgel heteromerizálódva olyan feszültségfüggő K^+ áramot hoz létre, amely lehetővé teszi a fényre adott elektromos válasz normális lefutását. Elsőként vetettük fel a lehetőségét, hogy a Kv2.1/Kv8.2 heteromer hozza létre az emlős fotoreceptor I_{Kx} áramát.
2. Elsőként mutattuk ki, hogy a G_q -fehérje kapcsolt receptorok ingerlése aktiválja a TRESK csatornát. Az aktivációt a citoplazma $[Ca^{2+}]$ növekedése hozza létre, de a kalcium ion nem közvetlenül hat a csatornára. A kalcium/kalmodulin-dependens protein foszfatáz kalcineurin defoszforilálja a TRESK csatornát és ezzel növeli a háttér K^+ áramot.
3. A kalcineurin döntően a szerin klaszter defoszforilációján keresztül szabályoz, amely magába foglalja a humán TRESK S262, S264 és S267 aminosavait. Ezen kívül szabályozó szereppel bír még az S252 aminosav defoszforilációja. A kalcineurin közvetlenül kötődik a humán TRESK PQIIS és LQLP motívumaihoz.
4. A kalcineurinon kívül *in vitro* kötődik még a csatornafehérjéhez a 14-3-3 adapter fehérje és a tubulin. A 14-3-3 kihorgonyzódása foszforiláció-függő módon történik, csak az S252 foszforilált állapotában jön létre. A 14-3-3 kötődése a TRESK-hez valószínűleg csökkenti a csatorna aktivitást. Emellett a 14-3-3 gátló hatást fejt ki a szerin klasztert foszforiláló kinázra.
5. A szerin klaszter (elsősorban S262 és S264) aminosavait a mikrotubulus-affinitás reguláló kinázok (MARK1-3) foszforilálják, ezzel erőteljes TRESK gátlást okozva. Az S252 aminosavat a protein kináz A foszforilálja.
6. Az új (novel) típusú protein kináz C (PKC η és ϵ) úgy eredményezi a humán TRESK defoszforilációját, hogy gátolja azt az endogén kinázt, amely a szerin klasztert foszforilálja. A szerin klasztert foszforiláló kináz aktivitásának hiányában a TRESK K^+ áram lassan megnő.
7. A Hg^{2+} a K_{2P} család más tagjaitól eltérően gátolja a TRESK csatornát.

6. AZ MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Pergel, E., Lengyel, M., Enyedi, P., **Czirják, G.** (2019) TRESK (K2P18.1) Background Potassium Channel Is Activated by Novel-Type Protein Kinase C via Dephosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 95, 661-672.
IF (2018): **3.853**
2. Olschewski, A., Veale, E. L., Nagy, B. M., Nagaraj, C., Kwapiszewska, G., Antigny, F., Lambert, M., Humbert, M., **Czirják, G.**, Enyedi, P., Mathie, A. (2017) TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: from cell biology to clinical implications. *Eur. Respir. J.* 50, 1700754.
IF(2017): **12.244**, Összes idézettség: 15, Független: 10
3. Lengyel, M., **Czirják, G.**, Enyedi, P. (2016) Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J. Biol. Chem.* 291, 13649-13661.
IF(2016): **4.125**, Összes idézettség: 18, Független: 15
4. Braun, G., Lengyel, M., Enyedi, P., **Czirják, G.** (2015) Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *Br. J. Pharmacol.* 172, 1728-1738.
IF(2015): **5.259**, Összes idézettség: 15, Független: 12
5. **Czirják, G.** (2015) PrinCCes: Continuity-based geometric decomposition and systematic visualization of the void repertoire of proteins. *J. Mol. Graph. Model.* 62, 118-127.
IF(2015): **1.674**, Összes idézettség: 4, Független: 4
6. **Czirják, G.**, and Enyedi, P. (2014) The LQLP calcineurin docking site is a major determinant of the calcium-dependent activation of human TRESK background K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 289, 29506-29518.
IF(2014): **4.573**, Összes idézettség: 11, Független: 8
7. Enyedi, P., Veres, I., Braun, G., **Czirják, G.** (2014) Tubulin binds to the cytoplasmic loop of TRESK background K⁺ channel in vitro. *PLoS One* 9, e97854.
IF(2014): **3.234**, Összes idézettség: 9, Független: 7
8. Enyedi, P., Braun, G., **Czirják, G.** (2012) TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 353, 75-81.
IF(2012): **4.039**, Összes idézettség: 29, Független: 27

9. Braun, G., Nemcsics, B., Enyedi, P., **Czirják, G.** (2011) TRESK background K⁺ channel is inhibited by PAR-1/MARK microtubule affinity-regulating kinases in *Xenopus* oocytes. *PLoS One* 6, e28119.
IF(2011): **4.092**, Összes idézettség: 15, Független: 9
10. **Czirják, G.**, Enyedi, P. (2010) TRESK background K⁺ channel is inhibited by phosphorylation via two distinct pathways. *J. Biol. Chem.* 285, 14549-14557.
IF(2010): **5.328**, Összes idézettség: 18, Független: 10
11. Enyedi, P., **Czirják, G.** (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* 90, 559-605.
IF(2010): **28.417**, Összes idézettség: 443, Független: 432
12. **Czirják, G.**, Vuity, D., Enyedi, P. (2008) Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J. Biol. Chem.* 283, 15672-15680.
IF(2008): **5.520**, Összes idézettség: 40, Független: 32
13. **Czirják, G.**, Tóth, Z. E., Enyedi, P. (2007) Characterization of the heteromeric potassium channel formed by K_v2.1 and the retinal subunit K_v8.2 in *Xenopus* oocytes. *J. Neurophysiol.* 98, 1213-1222.
IF(2007): **3.684**, Összes idézettség: 40, Független: 39
14. **Czirják, G.**, Enyedi, P. (2006) Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K⁺ channel, TRESK. *J. Biol. Chem.* 281, 14677-14682.
IF(2006): **5.808**, Összes idézettség: 73, Független: 63
15. **Czirják, G.**, Enyedi, P. (2006) Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol. Pharmacol.* 69, 1024-1032.
IF(2006): **4.469**, Összes idézettség: 35, Független: 27
16. Lopes, C. M., Rohács, T., **Czirják, G.**, Balla, T., Enyedi, P., Logothetis, D. E. (2005) PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J. Physiol.* 564, 117-129.
IF(2005): **4.272**, Összes idézettség: 128, Független: 115
17. **Czirják, G.**, Tóth, Z. E., Enyedi, P. (2004) The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J. Biol. Chem.* 279, 18550-18558.
IF(2004): **6.355**, Összes idézettség: 100, Független: 83

18. **Czirják, G.**, Enyedi, P. (2003) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* 63, 646-652.
IF(2003): **5.650**, Összes idézettség: 63, Független: 59
19. **Czirják, G.#**, Enyedi, P. (2002) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 16, 621-629.
IF(2002): **6.623**, Összes idézettség: 87, Független: 81
20. **Czirják, G.#**, Enyedi, P. (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* 277, 5426-5432.
IF(2002): **6.696**, Összes idézettség: 173, Független: 160
21. **Czirják, G.***, Petheő, G. L., Spät, A., Enyedi, P. (2001) Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281, C700-C708.
IF(2001): **3.896**, Összes idézettség: 87, Független: 76
22. **Czirják, G.***, Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., Enyedi, P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 14, 863-874.
IF(2000): **6.251**, Összes idézettség: 123, Független: 103

aláhúzás: levelező szerző

* Ph.D. értekezésben szereplő közlemény

PhD védés előtt megjelent, de a Ph.D. értekezésben nem szereplő közlemény

Az MTA doktori értekezés alapját képező közlemények tudományometriai adatai:

Közlemények száma: **22**

Első szerzős közlemények: **12**

Utolsó szerzős közlemények: **6**

Egyedüli szerzős közlemény: **1**

Társszerzős közlemény: **3**

Levelező szerzős közlemény: **7**

Kumulatív IF: **136.062**

Összes idézettség: **1526**

Független idézettség: **1372**

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetemet Prof. Enyedi Péternek, TDK és PhD témavezetőmnek, amiért laboratóriumába fogadott, éveken keresztül támogatta a munkámat és példátlan szabadságot engedett kísérleti terveim megvalósításában. Köszönettel tartozom Prof. Spät Andrásnak, amiért meghívott TDK hallgatónak, majd Enyedi Péter munkacsoportjába irányított. Spät professzor tudományos szemlélete meghatározta az Élettani Intézet értékrendjét és olyan iskolát teremtett, amelyből később vezető tudós személyiségek emelkedtek ki. Közéjük tartozik Prof. Hunyady László, az Élettani Intézet jelenlegi igazgatója, akinek szintén köszönetet mondok a folyamatos támogatásáért. Mindig konstruktív, problémamegoldó és pozitív hozzáállással fogadott, ha segítségért fordultam hozzá. Prof. Ligeti Erzsébetnek köszönöm a rendkívüli támogatást a PhD hallgatóim ügyeinek intézésében, illetve a mindig objektív, precíz és előrevivő javaslatait. Prof. Geiszt Miklós és Prof. Várnai Péter köszönetet érdemelnek a pályázatokkal kapcsolatos értékes tanácsaikért és a tisztán tudományos megközelítés iránti példamutató elkötelezettségük miatt.

Köszönöm dr. Braun Gabriella, Pergel Enikő és dr. Lengyel Miklós PhD hallgatók odaadó munkáját, illetve Vuity Drazsen, Nemcsics Balázs és Bozsaki Péter TDK hallgatók lelkes tevékenységét. Köszönettel tartozom továbbá az Élettani Intézet jelenlegi és korábbi munkatársainak azért az elfogadó, segítőkész és vidám légkörért, amely nap mint nap derültté teszi a munkámat az Élettani Intézetben.

Hálás vagyok laboratóriumunk asszisztensőinek a kitartó munkájukért. Külön szeretném kiemelni Veres Irént, akivel TDK hallgató korom óta folyamatosan együtt dolgozom és együtt több száz plazmid konstrukciót készítettünk. Dobolyi Alicenak a béka petesejt tisztításban és mikroinjektálásban nyújtott hathatós segítségért mondok elsősorban köszönetet. Kovács Erika és Busi Beáta korábbi asszisztensőinknek szintén köszönöm a kísérletek sikere érdekében végzett munkájukat.

Az eredményes kutatómunka feltétele a kutatáshoz szükséges anyagi forrás. Szeretném kifejezni köszönetemet a Semmelweis Egyetem korábbi Rektorának, Prof. Tulassay Tivadarnak, akinek első kutatási támogatásom köszönhetem. Köszönetet mondok ezen kívül az OTKA irodának és az NKFIH-nak az F67743 és K127988 támogatásokért, a Magyar Tudományos Akadémiának a Bolyai ösztöndíjakért, valamint a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar Dékánjának a Merit díjakért.

Végül családomnak, szüleimnek, feleségemnek, testvéremnek és gyermekeimnek tartozom hálával, akik a munkám végzéséhez szükséges nyugodt családi háttér mellett mindig biztosítottak támogatásukról.

8. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK, RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

14-3-3	adapter fehérje, nevét kromatográfiás frakciók sorszámaról kapta
4-AP	4-aminopiridin, feszültségfüggő (Kv1) K ⁺ csatorna gátlószer
ATP	adenozin trifoszfát
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát, másodlagos hírvivő, PKA aktivátora
cRNS	komplementer (complementary) RNS, cDNS-ről (<i>in vitro</i>) átírt RNS
mRNS	hírvivő (messenger) RNS
cDNS	komplementer (complementary) DNS, (m)RNS-ről átírt DNS
CnA	kalcineurin A (katalitikus) alegység
CnB	kalcineurin B (regulátoros) alegység
DNS	dezoxiribonukleinsav
E.coli	Escherichia coli, Gram negatív baktérium
EC	extracelluláris, sejten kívüli
ER	endoplazmatikus retikulum
EGTA	etilén glikol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav, kelátor
EST	expressed sequence tag, találmra szekvenált cDNS
GST	glutation-S-tranzferáz, glutation-kötő fúziós fehérje részlet
HEPES	4-(2-hydroxietyl)-1-piperazineetánsulfonsav, pH puffer
His ₆	hexahisztidin tag (cimke), 6 hisztidin egymás után: köt Ni-NTA-hoz
His ₈	oktahisztidin tag (cimke), 8 hisztidin egymás után: köt Ni-NTA-hoz
IBMX	3-izobutil-1-metilxantin, foszfodieszteráz (cAMP lebomlás) gátló
IC	intracelluláris, sejten belüli
IC ₅₀	inhibitory concentration 50, félmaximális gátló koncentráció
IP ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát, kalciumot szabadít fel az IC raktárból
LPA	lizofoszfatidsav
MARK	mikrotubulus (asszociált fehérje) affinitás reguláló kináz
MARK2	mikrotubulus (asszociált fehérje) affinitás reguláló kináz 2
NFAT	nuclear factor of activated T cells, transzkripció faktor
NTA	nitrilotriacetic acid, kelátor, Ni ²⁺ komplexe His _{6/8} -at köt
NMRI	albínó kísérleti egér törzs, "Naval Medical Research Institute"
P	pórusdomén, a K ⁺ csatorna pórust meghatározó szerkezeti elem
PCR	polimeráz láncreakció, DNS sokszorozó módszer
PKA	protein kináz A, cAMP által aktivált szerin-treonin kináz
pS-Raf259	Raf fehérjéből foszfopeptid, nagy affinitással köt a 14-3-3-hoz
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripciót ((m)RNS-ről (c)DNS átírást) követő PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate, ionos detergens, fehérje denaturáló ágens
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

SERCA	Szarko-Endoplazmatikus Retikulum Kalcium ATPáz, ER Ca ²⁺ pumpa
TALK	TWIK-related Alkaline-activated K ⁺ channel
TASK	TWIK-related Acid Sensitive K ⁺ channel
TEA	tetraetil-ammonium, feszültségfüggő K ⁺ csatorna gátlószer
THIK	TWIK-related Halothane Inhibited K ⁺ channel
TMS	transzmembrán szegmens
TREK	TWIK-Related K ⁺ channel
TRESK	TWIK-Related Spinal cord K ⁺ channel
TWIK	Tandem of pore domains in a Weakly Inwardly rectifying K ⁺ channel