

MTA doktori értekezés

# **A TRESK háttér kálium csatorna molekuláris szabályozási mechanizmusainak vizsgálata**

**Dr. Czirják Gábor**

Semmelweis Egyetem

Élettani Intézet



Budapest

2020

**TARTALOMJEGYZÉK**

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....                                                          | 4  |
| 2. BEVEZETÉS .....                                                                    | 6  |
| 2.1 A K <sub>2</sub> P háttér kálium csatornák általános jellemzése .....             | 7  |
| 2.1.1 A K <sub>2</sub> P csatornák felfedezésének előzményei .....                    | 7  |
| 2.1.2 Szerkezeti sajátosságok.....                                                    | 8  |
| 2.1.3 Az emberi K <sub>2</sub> P csatornák osztályozása.....                          | 13 |
| 2.1.4 Elektrofiziológiai tulajdonságok .....                                          | 14 |
| 2.1.5 Szabályozási mechanizmusok .....                                                | 20 |
| 2.1.6 Élettani és orvosi jelentőség.....                                              | 26 |
| 2.1.6.1 A K <sub>2</sub> P csatornák jelentősége az általános anesztéziában .....     | 27 |
| 2.1.6.2 A TREK-1 az antidepresszáns kezelés potenciális célpontja ....                | 28 |
| 2.1.6.3 A TASK és TALK csatornák a kemoreceptorokban .....                            | 31 |
| 2.1.6.4 A TASK-1 és a pulmonális hipertónia kapcsolata .....                          | 33 |
| 2.1.6.5 K <sub>2</sub> P csatornák a szívben.....                                     | 34 |
| 2.2 Munkacsoportunk korábbi eredményei a K <sub>2</sub> P területen .....             | 36 |
| 2.2.1 A TASK-1 és TASK-3 kifejeződik a glomerulózsa sejtben .....                     | 36 |
| 2.2.2 A TASK-1 csatorna gátlása foszfolipáz C-n keresztül jön létre .....             | 38 |
| 2.2.3 A TASK-1 és TASK-3 alegységek heterodimert képeznek.....                        | 41 |
| 2.3 Az értekezésben bemutatott kísérletek motivációja .....                           | 47 |
| 3. CÉLKITŰZÉSEK .....                                                                 | 50 |
| 4. MÓDSZEREK.....                                                                     | 51 |
| 4.1 Molekuláris biológia .....                                                        | 51 |
| 4.2 A <i>Xenopus</i> petesejtek preparálása és mikroinjektálása.....                  | 52 |
| 4.3 Két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) mérés .....                          | 53 |
| 4.4 Patch-clamp mérés .....                                                           | 54 |
| 4.5 Rekombináns fehérjék tisztítása .....                                             | 55 |
| 4.6 <i>In situ</i> hibridizáció .....                                                 | 56 |
| 4.7 Immunoblot .....                                                                  | 57 |
| 4.8 GST és His <sub>6</sub> /His <sub>8</sub> "pulldown" kísérletek .....             | 57 |
| 4.9 <i>In vitro</i> fehérje foszforiláció vizsgálat .....                             | 58 |
| 4.10 <i>In vitro</i> foszfatáz mérések radioaktív jelölés eltávolítással.....         | 60 |
| 4.11 <i>In vivo</i> foszforiláció kimutatása Phos <sup>TM</sup> -tag reagenssel ..... | 61 |
| 4.12 Statisztikai analízis.....                                                       | 62 |

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5. EREDMÉNYEK .....                                                             | 64  |
| 5.1 A TRESK és Kv8.2 gének azonosítása a humán genomban .....                   | 64  |
| 5.2 A TRESK funkcionális expressziója <i>Xenopus</i> petesejtben .....          | 68  |
| 5.3 A kalcium-mobilizáló receptorok ingerlése aktiválja a TRESK-et.....         | 71  |
| 5.4 A citoplazma $[Ca^{2+}]$ növekedése felelős a TRESK aktivációért .....      | 73  |
| 5.5 A kalcium hatása a TRESK csatornára közvetett .....                         | 76  |
| 5.6 A kalcineurin hozza létre a kalcium-függő TRESK aktivációt.....             | 79  |
| 5.7 Alegységenként négy szerin lehet a kalcineurin célpontja .....              | 81  |
| 5.8 A kalcineurin kötődik a TRESK PxIxIT-szerű motívumához.....                 | 89  |
| 5.9 A humán TRESK alegység két kalcineurin-kötőhelyet tartalmaz .....           | 97  |
| 5.10 A TRESK hurok régióhoz <i>in vitro</i> kötődik a 14-3-3 és a tubulin ..... | 111 |
| 5.11 A 14-3-3 adapter fehérje részt vesz a TRESK szabályozásában .....          | 115 |
| 5.12 A TRESK csatornát a protein kináz A és MARK foszforilálják .....           | 133 |
| 5.13 A PKC a szerin klaszter defoszforilációján keresztül hat .....             | 145 |
| 5.14 A $Hg^{2+}$ gátolja a TRESK csatornát.....                                 | 162 |
| 6. MEGBESZÉLÉS.....                                                             | 167 |
| 6.1 A TRESK háttér $K^{+}$ csatorna általános jellemzői.....                    | 167 |
| 6.2 A TRESK molekuláris szabályozási mechanizmusai .....                        | 173 |
| 6.3 Élettani és orvosi jelentőség .....                                         | 184 |
| 7. AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA .....                                     | 195 |
| 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....                                                    | 196 |
| 9. FÜGGELÉK.....                                                                | 198 |
| 10. IRODALOMJEGYZÉK.....                                                        | 199 |
| 11. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE .....                      | 225 |

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|                                 |                                                                                                                 |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>4<math>\alpha</math>-PDD</b> | 4 $\alpha$ -forbol-12,13-didekanoát ( <b>4<math>\alpha</math>-phorbol</b> 12,13- <b>didecanoate</b> )           |
| <b>7TM</b>                      | hét transzmembrán régióval rendelkező (receptor)                                                                |
| <b>AA</b>                       | arachidonsav ( <b>arachidonic acid</b> )                                                                        |
| <b>AKAP150</b>                  | 150 kilodaltonos protein kináz A-t horgonyzó fehérje<br>( <b>A-kinase-anchoring protein 150</b> )               |
| <b>AMP</b>                      | adenozin-5'-monofoszfát ( <b>adenosine monophosphate</b> )                                                      |
| <b>ATP</b>                      | adenozin-5'-trifoszfát ( <b>adenosine triphosphate</b> )                                                        |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]</b>        | Ca <sup>2+</sup> ionkoncentráció                                                                                |
| <b>cAMP</b>                     | 3'-5'-ciklikus adenzin-monofoszfát                                                                              |
| <b>CREB</b>                     | <b>cAMP response element-binding protein</b> (transzkripció faktor)                                             |
| <b>CsA</b>                      | ciklosporin A                                                                                                   |
| <b>DRG</b>                      | hátsó gyöki ganglion ( <b>dorsal root ganglion</b> )                                                            |
| <b>EDTA</b>                     | etilén- <b>diamin-tetraecetsav</b> (kétértékű ion kelátor)                                                      |
| <b>EGTA</b>                     | etilén- <b>glikol-bisz</b> ( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'- <b>tetraecetsav</b> (Ca <sup>2+</sup> kelátor) |
| <b>ER</b>                       | endoplazmatikus <b>retikulum</b>                                                                                |
| <b>EC</b>                       | <b>extracelluláris</b>                                                                                          |
| <b>EC<sub>50</sub></b>          | fél-maximális aktiváló koncentráció                                                                             |
| <b>GHK</b>                      | <b>Goldman-Hodgkin-Katz</b>                                                                                     |
| <b>GPCR</b>                     | G-fehérje kapcsolt receptor ( <b>G protein-coupled receptor</b> )                                               |
| <b>GST</b>                      | <b>glutation-S-transzferáz</b>                                                                                  |
| <b>h-</b>                       | humán                                                                                                           |
| <b>HEPES</b>                    | 4-(2- <b>hidroxietil</b> )-1- <b>piperazin-etánszulfonsav</b>                                                   |
| <b>IBA</b>                      | isobutylalkenyl <b>amide</b>                                                                                    |
| <b>IC<sub>50</sub></b>          | fél-maximális gátló koncentráció                                                                                |
| <b>IP<sub>3</sub></b>           | inozitol-1,4,5-triszfoszfát                                                                                     |
| <b>[K<sup>+</sup>]</b>          | K <sup>+</sup> ionkoncentráció                                                                                  |
| <b>K<sub>Ca</sub></b>           | kalcium-aktivált K <sup>+</sup> csatorna                                                                        |
| <b>KCsA</b>                     | <b>K<sup>+</sup> channel of streptomyces A</b>                                                                  |
| <b>kD(a)</b>                    | kilodalton                                                                                                      |
| <b>K<sub>IR</sub></b>           | befelé rektifikáló K <sup>+</sup> csatorna ( <b>inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel</b> )                 |

|                       |                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>KO</b>             | génirtott (knock-out) (állat)                                                                                                                                                    |
| <b>K<sub>v</sub></b>  | feszültségfüggő K <sup>+</sup> csatorna ( <b>v</b> oltage-dependent <b>K</b> <sup>+</sup> channel)                                                                               |
| <b>K<sub>2P</sub></b> | alegységenként két pórusdoménal rendelkező K <sup>+</sup> csatorna                                                                                                               |
| <b>LPA</b>            | lizofoszfátidsav ( <b>l</b> ysophosphatidic <b>a</b> cid)                                                                                                                        |
| <b>m-</b>             | egér ( <b>m</b> ouse)                                                                                                                                                            |
| <b>MARK</b>           | <b>m</b> icrotubule <b>a</b> ffinity- <b>r</b> egulating <b>k</b> inase                                                                                                          |
| <b>NFAT</b>           | <b>n</b> uclear <b>f</b> actor of <b>a</b> ctivated <b>T</b> -cells (transzkripció faktor)                                                                                       |
| <b>NTA</b>            | <b>n</b> itrilotriacetic <b>a</b> cid                                                                                                                                            |
| <b>P</b>              | pórusdomén                                                                                                                                                                       |
| <b>PCR</b>            | polimeráz láncreakció ( <b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction)                                                                                                       |
| <b>PKA</b>            | <b>p</b> rotein <b>k</b> ináz <b>A</b>                                                                                                                                           |
| <b>PKC</b>            | <b>p</b> rotein <b>k</b> ináz <b>C</b>                                                                                                                                           |
| <b>PMA</b>            | forbol-mirisztol-acetát ( <b>p</b> horbol 12- <b>m</b> yristate 13- <b>a</b> cetate)                                                                                             |
| <b>PMSF</b>           | fenil-metil-szulfonil-fluorid ( <b>p</b> henyl <b>m</b> ethyl <b>s</b> ulfonyl <b>f</b> luoride)                                                                                 |
| <b>RR</b>             | ruténium vörös ( <b>r</b> uthenium <b>r</b> ed)                                                                                                                                  |
| <b>RT-PCR</b>         | reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció                                                                                                                               |
| <b>SDS-PAGE</b>       | nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis<br>( <b>s</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfate <b>p</b> oly <b>a</b> crylamide <b>g</b> el <b>e</b> lectrophoresis) |
| <b>TALK</b>           | TWIK-related <b>A</b> Lkaline pH-activated <b>K</b> <sup>+</sup> channel                                                                                                         |
| <b>TASK</b>           | TWIK-related <b>A</b> cid- <b>S</b> ensitive <b>K</b> <sup>+</sup> channel                                                                                                       |
| <b>THIK</b>           | Tandem pore domain in a <b>H</b> alothane- <b>I</b> nhibited <b>K</b> <sup>+</sup> channel                                                                                       |
| <b>TM(S)</b>          | transz <b>m</b> embrán ( <b>s</b> zegmens)                                                                                                                                       |
| <b>TRAAK</b>          | TWIK- <b>R</b> elated <b>A</b> rachidonic <b>A</b> cid-activated <b>K</b> <sup>+</sup> channel                                                                                   |
| <b>TREK</b>           | TWIK- <b>R</b> elated <b>K</b> <sup>+</sup> channel                                                                                                                              |
| <b>TRESK</b>          | TWIK- <b>R</b> elated <b>S</b> pinal cord <b>K</b> <sup>+</sup> channel                                                                                                          |
| <b>TRG</b>            | trigeminális <b>g</b> anglion                                                                                                                                                    |
| <b>TRP</b>            | tranziens receptor <b>p</b> otenciál (ioncsatorna)                                                                                                                               |
| <b>TRPV1</b>          | tranziens receptor <b>p</b> otenciál <b>v</b> anilloid- <b>1</b> (ioncsatorna)                                                                                                   |
| <b>TWIK</b>           | Tandem of pore domains in a <b>W</b> eakly <b>I</b> nward rectifying <b>K</b> <sup>+</sup> channel                                                                               |
| <b>vö.</b>            | vesd össze                                                                                                                                                                       |
| <b>vs.</b>            | versus (szemben)                                                                                                                                                                 |
| <b>WT</b>             | vad típusú ( <b>w</b> ild <b>t</b> ype)                                                                                                                                          |

## 2. BEVEZETÉS

Munkánk kezdetén a TRESK (TWIK-Related Spinal cord K<sup>+</sup> channel) háttér K<sup>+</sup> 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 [1-3] és a TRESK receptor-mediált szabályozását elsőként vizsgáljam [2].

Kimutattuk, hogy a TRESK a korábban leírt K<sub>2P</sub> háttér K<sup>+</sup> csatornáktól eltérő módon szabályozódik a G<sub>q</sub>-fehérje kapcsolt receptorok ingerlésének hatására [2]. Míg az egyéb, pl. TREK és TASK, K<sub>2P</sub> 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 [2]. 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 közzeltünk az irodalomban [2,4-9].

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<sup>+</sup> csatorna a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok szenzoros neuronjaiban [10,11]. Jelentős mennyiségben megtalálható a TRESK a fájdalomérzésért felelős bizonyos érzőneuron szubpopulációkban, és befolyásolja ezek ingerlékenységét, illetve a fájdalmas ingerre adott válasz intenzitását [12-14]. A TRESK génhiányos (knock-out) egér modellben fokozott érzékenység jelentkezik a fájdalmas mechanikai, hő és kémiai ingerekre a feji régióban [15,16]. Ezzel jó

összhangban a TRESK egyes speciális domináns-negatív mutációi az öröklődő migrénes fejfájás egy ritka formáját okozzák [17,18]. 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 vizsgálatokhoz a TRESK csatorna fájdalomérzésben betöltött szerepével kapcsolatban.

## **2.1 A $K_{2P}$ háttér kálium csatornák általános jellemzése**

### **2.1.1 A $K_{2P}$ csatornák felfedezésének előzményei**

A plazmamembrán jelentős kálium permeabilitását már abban a korszakban felismerték, amikor az elektrofiziológiai alapfogalmak az ioncsatornák működéséről és a membránpotenciálról még csak kialakulóban voltak [19,20]. A Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) homogén transzmembrán térerősség modell (constant-field theory) kidolgozásánál – a negatív nyugalmi membránpotenciál kialakulásának magyarázatára – feltételezték a sejtmembrán nagy kálium konduktanciáját [21]. Ezt a nagy nyugalmi  $K^+$  vezetőképességet legmegfelelőbben azzal lehetett értelmezni, hogy a membránban  $K^+$  ionra szelektív pórusok találhatók, amelyeken keresztül háttér (csurgó, "leak")  $K^+$  áram folyik. Fizikai számításokat végeztek a szabályozatlan  $K^+$  szelektív pórusokon átfolyó áram nagyságának meghatározására [21,22]. Ennek eredményeként a GHK elmélet megjósolta a membránpotenciáltól független működésű háttér  $K^+$  csatornák alapvető elektrofiziológiai tulajdonságait. 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 a 1990-es évek második felében. Eddigre a többi nagy  $K^+$  csatorna család egyes képviselőit molekuláris biológiai módszerekkel (pl. expressziós vagy pozicionális klónozással) már azonosították és a feszültségfüggő ( $K_v$ ), befelé rektifikáló ( $K_{IR}$ ) és kalcium-aktivált  $K^+$  csatornák ( $K_{Ca}$ ) tulajdonságait részletesen tanulmányozták [23-26]. A membránpotenciáltól kevésbé függő háttér  $K^+$  csatornák csurgó (leak) áramának vizsgálata viszont nem került a tudományos figyelem előterébe.

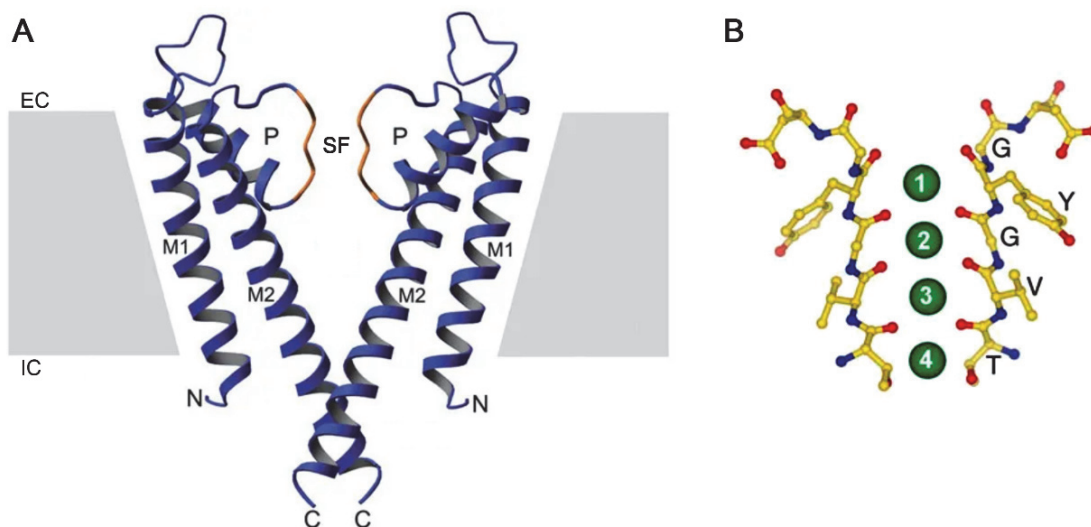
Végül 1996-ban klónozták a TWIK-1 (Tandem of pore domains in a Weakly Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel) cDNS-ét, az elsőként felfedezett emlős háttér  $K^+$  csatornát [27]. A TWIK-1 alegység két  $K^+$  csatorna pórusdomént is tartalmaz és ez a szerkezeti sajátosság a későbbiekben a többi háttér  $K^+$  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 (ld. alább). 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 (ld. a [28] összefoglalót). 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.

### 2.1.2 Szerkezeti sajátosságok

A nyitott ioncsatornák pórusa folyamatosan átjárható utat képez a vezetett ionok számára a lipid kettősrétegen keresztül. A  $K^+$  csatornák pórusa különleges abból a szempontból, hogy ezen az útvonalon, az élettani körülmények között magas (mM-os) koncentrációban előforduló ionok közül

lényegében csak a  $K^+$  képes átjutni (az egyéb kationok, pl. a  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$  nem). A nagyfokú szelektivitásért a csatorna pórus extracelluláris végéhez közel található, mind a mai napig intenzíven vizsgált, különleges biofizikai tulajdonságokkal rendelkező szűkült pórusszakasz felelős, melyet szelektivitási filter régióknak neveznek. Mai ismereteink szerint a plazmamembránban található  $K^+$  csatornák szelektivitási filter régióját ugyanazok a konzervált szerkezeti elemek alakítják ki minden fajban az archebaktériumoktól (Archaea) az emberig [29].

A szelektivitási filternek aminosav szinten a pórusmotívum ( $K^+$  channel signature sequence) felel meg, amely magába foglalja az erősen konzervált G(Y/F/L)G aminosav szekvenciát. Ezek az aminosavak közvetlenül részt vesznek a szelektivitási filter  $K^+$  kötő helyeinek létrehozásában. A pórusmotívumtól N-terminális irányban található a szintén konzervált pórushélix szekvencia; ennek a két szerkezeti elemnek az együttese alkotja a  $K^+$  csatorna pórusdomént (1. ábra).

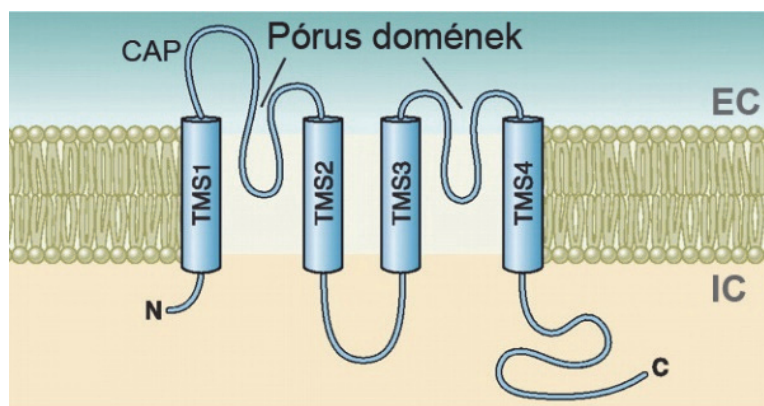


**1. ábra: A  $K^+$  csatorna pórus általános szerkezete, a KCsA csatorna példáján.**

**A.** Két alegység sematikus szalag reprezentációja látható (a PDB:1K4C kristályszerkezetből). Egy alegység két transzmembrán szegmensből (**M1** és **M2**), illetve a köztük található pórusdoménből (**P**) épül fel. A tetramer másik két alegysége a papír síkjára merőlegesen kifelé, illetve befelé helyezkedne el. **P**: pórusdomén, magába foglalja a rövid pórushélixet (kék) és a pórusmotívumot a szelektivitási filter régióban (sárga); **SF**: szelektivitási filter; **M1**: külső (transzmembrán) hélix; **M2**: belső (transzmembrán) hélix; **N** és **C**: N és C terminális; **EC** és **IC**: extra- és intracelluláris oldal. **B.** A pórusmotívum aminosav maradékainak pálcika reprezentációja látható. A KCsA pórusmotívumának szekvenciája TVGYG. Az oxigén atomokat piros, a nitrogéneket pedig kék színnel ábrázolták. A zöld körök a  $K^+$  kötőhelyeket szimbolizálják a szelektivitási filterben. Módosítva a [30] és [31] közleményekből.

A pórusdomén polipeptid lánc az extracelluláris irányból a lipid kettősrétegbe merülő hurkot alkot. Az N-terminális pórushélix a membránban először ferdén az intracelluláris oldal (és a csatorna tengelye) felé halad, aztán a polipeptid lánc visszafordul az extracelluláris irányba és a már nem helikális szerkezetű pórusmotívum a pórus falát alkotja a szelektivitási filter területén (1. ábra). Minden  $K^+$  csatornában négyszer ismétlődik ez a közös szerkezeti elem, a négy pórusdomén a szelektivitási filterben a pórus tengelye körül forgásszimmetrikusan rendeződik el. Mivel a legtöbb  $K^+$  csatorna típusban egy alegységben egy pórusdomén található, ezért négy alegység képez működő csatornát. Vagyis a  $K^+$  csatornák többségét a pórusképző alegységek tetramere alkotja.

Ezzel szemben, a  $K_{2P}$  csatornák alegységként két pórusdomént tartalmaznak. Ennek megfelelően a  $K_{2P}$  alegységek dimer formában alkotnak működőképes csatornát, ebben az alegységek mindkét pórusdoménje részt vesz a szelektivitási filter létrehozásában (2. ábra).

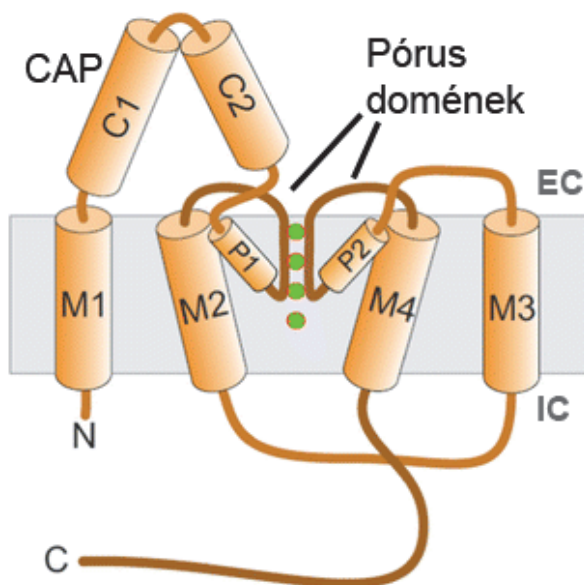


**2. ábra: A  $K_{2P}$  csatornák sematikus transzmembrán topológiája.**

A  $K_{2P}$  háttér  $K^+$  csatorna alegység négy transzmembrán szegmenst és két pórusdomént tartalmaz, vagyis 4TMS/2P szerkezetű. **TMS1-4:** transzmembrán szegmensek; **CAP:** extracelluláris "sapka" domén; **N** és **C:** N és C terminális; **EC** és **IC:** extra- és intracelluláris oldal. Módosítva a [28] közleményből.

Az emlős fajokban a  $K_{2P}$  csatorna alegységekre a 4TMS/2P szerkezet jellemző. Élesztőgombában leírtak olyan alegységként két pórusdoménnal rendelkező  $K^+$  csatornát is (TOK, YORK), amelyben alegységként nyolc transzmembrán szegmens található (8TMS/2P) [32,33]. Úgy tűnik azonban, hogy az ilyen szerkezetű csatornák csak a gombákban találhatók meg. A  $K_{2P}$

csatornákra általában jellemző 4TMS/2P szerkezet a tökéletes forgásszimmetria megbomlását jelenti. Egy alegységen belül a két pórusdomén (és azon belül a pórusmotívum) szekvenciája is különbözhet. Emellett az alegység külső (1. és 3.), illetve belső (2. és 4.) transzmembrán szegmensei sem ekvivalensek. Az egyes szerkezeti elemek térbeli viszonyát, pl. a pórusdomének és a transzmembrán szegmensek elrendeződését, az előző sematikus topológiánál jobban tükrözi, ha megengedjük a polipeptid lánc kereszteződését a síkreprezentáción (3. ábra).

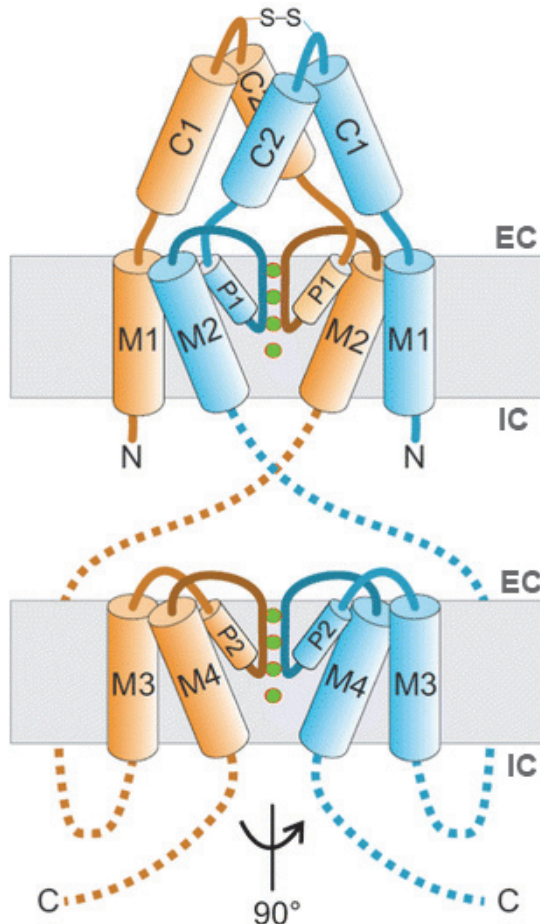


**3. ábra: A  $K_{2P}$  csatorna alegység szerkezet sematikus ábrázolása síkban.**

**M1 és M3:** külső transzmembrán szegmensek; **M2 és M4:** belső transzmembrán szegmensek; **P1 és P2:** pórushélixek; **C1 és C2:** a "sapka" (CAP) domén kialakításában szereplő hélixek; **N és C:** N és C terminális; **EC és IC:** extra- és intracelluláris oldal. A zöld körök a  $K^+$  kötőhelyeket mutatják. Módosítva a [34] közleményből.

Valójában azonban a  $K_{2P}$  csatorna alegység transzmembrán szegmensei nem egy síkban helyezkednek el. Továbbá az egy alegységhez tartozó pórusdomének sem a pórus átellenes oldalán találhatók, vagyis a csatorna forgástengelye körül egymáshoz képest nem  $180^\circ$ -os szöget zárnak be, hanem inkább  $90^\circ$ -et. Ez a felépítés sematikusán leginkább úgy közelíthető, ha az egyes szerkezeti elemeket két egymásra merőleges síkban ábrázoljuk, ahol a két sík a csatorna forgástengelyében metszi egymást (4. ábra). Szintén nem mutatja jól a 3. ábra, hogy a legtöbb tényleges kristályszerkezetben a két alegység első transzmembrán szegmensének térbeli helyzete felcserélt ("domain swapping"). Az egyik alegység M1 szegmense nem a saját, hanem a másik alegység M2 szegmenséhez kerül közel (ld. a 4. ábrán). Ezek a sajátosságok általánosan megfigyelhetők a TWIK-1 [35], a TREK-1 [36], a

TREK-2 [37] és a TRAAK [38-40] kristályszerkezetében (5. ábra). Valószínűleg az alapvető szerkezeti elemek, a transzmembrán szegmensek és a pórusdomének hasonlóan helyezkednek el a TRESK csatornában is, azonban ennek atomi felbontású struktúráját eddig nem sikerült meghatározni.



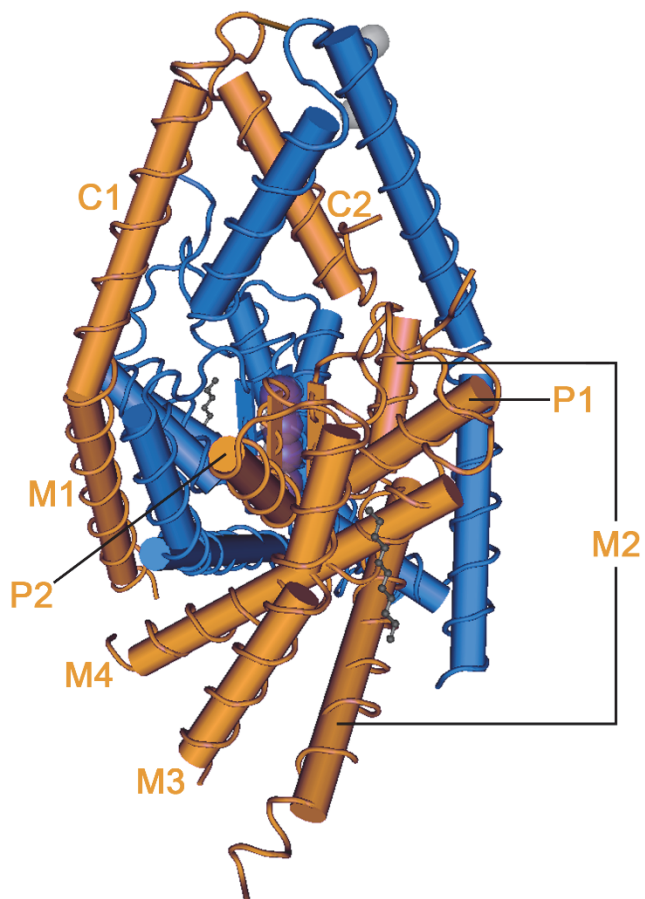
**5. ábra →**  
**A humán TREK-2 kristályszerkezet 3D ránézeti képe az extracelluláris tér irányából.**

Az 4. ábrán bemutatott szerkezeti elemeket bejelöltem az egyik (narancsszínű) alegységen. A szelektivitási filtert (a szerkezet központjában) függőleges téglalapok jelölik a szürke gömbökkel illusztrált K<sup>+</sup> kötő helyek körül. Az ábrát a Cn3D 4.3.1 programmal készítettem a PDB:4BW5 kristályszerkezetből [37]. Az α-héliceket csövekkel, a nem helikális szakaszokat zsinórként ábrázolta a program. A két alegységet különböző színek (narancs és kék) jelölik.

← **4. ábra: A K<sub>2</sub>P csatorna dimer szerkezetének sematikus ábrázolása két derékszöget bezáró síkon.**

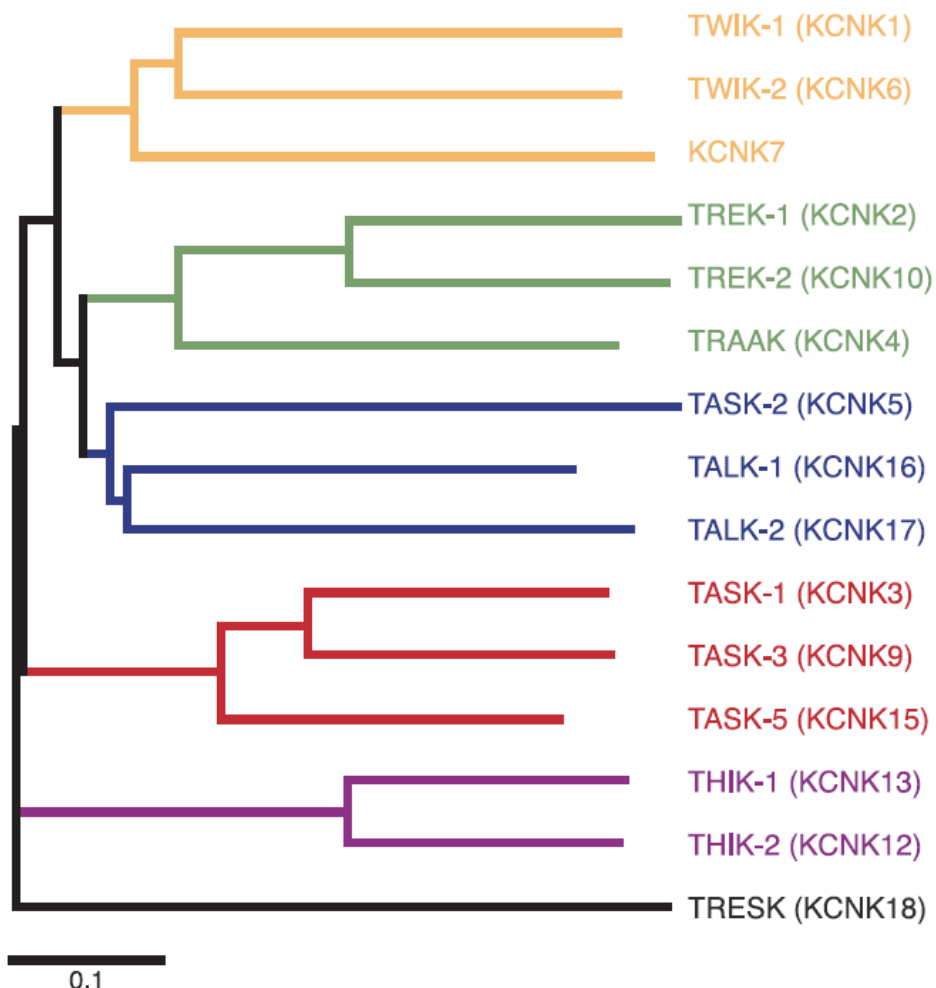
Az alsó és felső panelek két egymással 90°-os szöget bezáró síkon mutatják a szerkezeti elemeket (ahogy azt az alsó panel alatti forgatás szimbólum jelöli). A két panelen ugyanazokat a K<sup>+</sup> kötő helyeket jelölik a zöld körök. A két alegységet különböző színekkel (narancs és kék) ábrázolták.

**M1 és M3:** külső transzmembrán szegmensek; **M2 és M4:** belső transzmembrán szegmensek; **P1 és P2:** pórushélixek; **C1 és C2:** a "sapka" (CAP) domén kialakításában szereplő hélixek; **N** és **C:** N és C terminális; **EC** és **IC:** extra- és intracelluláris oldal. Módosítva a [34] közleményből.



### 2.1.3 Az emberi $K_{2P}$ csatornák osztályozása

Tizenöt humán háttér  $K^+$  csatorna alegység génnek megfelelő cDNS-t klónoztak, amelyeket szerkezeti és funkcionális hasonlóságok alapján hat alcsaládba oszthatunk (6. ábra).



**6. ábra: A humán  $K_{2P}$  csatornák aminosav szekvenciáját összehasonlító dendrogram.**

Az alcsaládokat különböző színek jelölik. A csatornák hagyományos neve mellett feltüntettük a gén nevét is zárójelben, a Human Genome Organization (HUGO) által elfogadott módon. A gének sorszámozása egyben megfelel a  $K_{2P}$  csatorna (fehérje) alegységek számozásának is. A dendrogram a Clustal W programmal készült. A dendrogram alatti lépték aminosavanként átlagosan 0.1 helyettesítésnek megfelelő szekvencia különbséget jelöl. Módosítva a [28] közleményből.

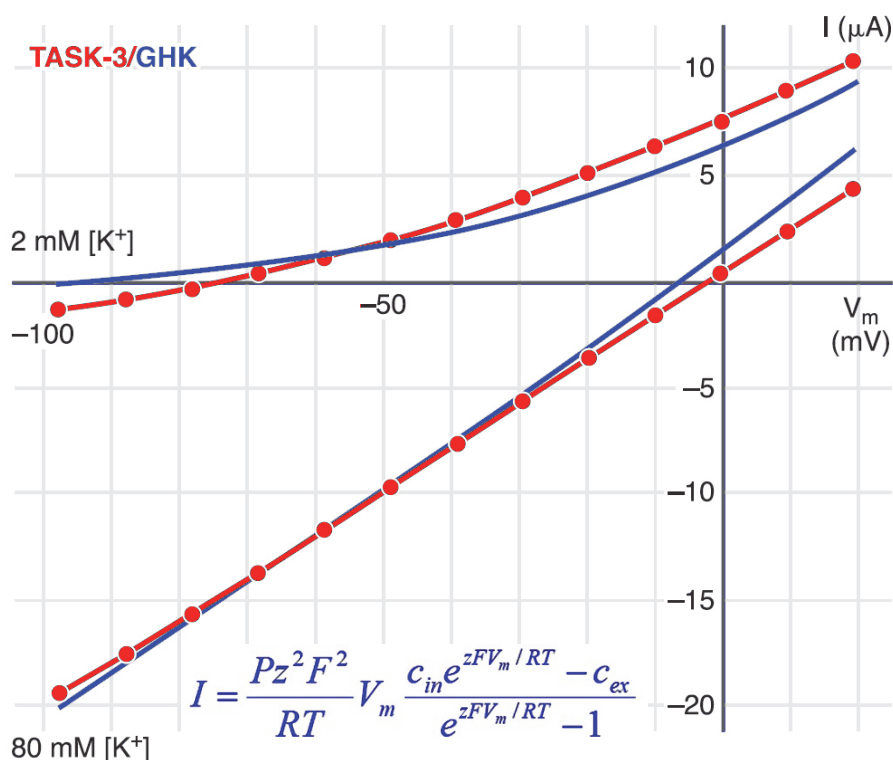
A tizenöt  $K_{2P}$  csatorna génnek a KCNK1-18 számozás felel meg; mivel a KCNK8, KCNK11 és KCNK14 gének valójában nem léteznek, ezért ezek a számok kimaradnak a sorozatból. Jól leolvasható a dendrogramról, hogy a

távolabbi rokonságban álló alegységek között a szekvencia azonosság feltűnően kicsi. Pl. a TWIK-1 és a TREK-1 alegységek szekvencia azonossága mindössze 28 % [41]. A szekvencia azonosság elsősorban a transzmembrán régiók és a pórusdomének területén jellemző, ezek a szerkezeti elemek valószínűleg alapvetők a konzervált csatorna kapuzás és  $K^+$  permeabilitás kialakításában. Jó közelítéssel úgy tekinthetjük, hogy az egyes  $K_{2P}$  csatorna alcsaládok olyan nagy mértékben különböznek egymástól, mint az egyéb  $K^+$  csatorna családoktól. A mindössze tizenöt tag hat alcsaládba sorolását az alcsaládok közötti jelentős különbség indokolja. A TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK és TRESK alcsaládok tagjai egymástól nem csak az aminosav szekvenciájukban térnek el jelentősen. A citoplazmatikus és extracelluláris régiók csaknem teljes különbözősége jó összhangban van a csatornák rendkívül eltérő szabályozási mechanizmusaival. Az ugyanazon alcsaládba tartozó csatornák egyes tulajdonságai jóval gyakrabban megegyeznek [28].

#### 2.1.4 Elektrofiziológiai tulajdonságok

A  $K_{2P}$  csatornák kifejező(őd)ése háttér (csurgó, leak) kálium áramot eredményez. A csatornák működését, a makroszkópos áramuk feszültségfüggését, első közelítésben jól leírja a Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) áram egyenlet (7. ábra). Az egyenlet nyilvánvalóan az idealizált háttér  $K^+$  csatorna működésére vonatkozik. A valódi csatornák és az idealizált modell közötti jelentős egyezés miatt azonban érdemes átgondolni, hogy milyen tulajdonságai lennének egy olyan háttér  $K^+$  csatornának, amely pontosan követi a GHK áram egyenletet.

Az ideális háttér  $K^+$  csatorna nem mutat feszültségfüggő kapuzást, vagyis a nyitási valószínűsége ( $P_o$ ) független a membránpotenciál értékétől. A nyitási valószínűség szintén független az extra- és intracelluláris  $K^+$  koncentráció nagyságától. Egy másik fontos tulajdonsága ennek az elméleti háttér  $K^+$  áramnak, hogy az áram nagysága "pillanatszerűen" követi a



**7. ábra: A *Xenopus* petesejtben expresszált TASK-3 csatornák feszültség-áram összefüggése 2 és 80 mM extracelluláris K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatokban.**

A TASK-3 csatornákat kifejező *Xenopus* petesejt K<sup>+</sup> áramait a *piros* mérési pontok mutatják. A TASK-3 áram nagysága mintegy százszorosan meghaladja a nem expresszált petesejt endogén K<sup>+</sup> áramának amplitúdóját (nem mutatom). A feszültség-áram összefüggés közelítőleg egy origón átmenő egyenes a 80 mM extracelluláris K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatban. Alacsony (2 mM) extracelluláris [K<sup>+</sup>] esetén viszont a befelé irányuló áram töredékére csökken a negatív membránpotenciál értékeken és a függvény a vízszintes tengelyhez közelít. A mért TASK-3 áramokat (*piros*) jól közelítik a Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) áram egyenletből számított görbeillesztések (*kék* görbék). A GHK áram egyenletet ld. az ábra alján szintén *kék* színnel (445. old. a [42] könyvben); P: permeabilitás; z: töltésszám (K<sup>+</sup>-ra +1); F: Faraday állandó; R: általános gázállandó; T: abszolút hőmérséklet; V<sub>m</sub>: membránpotenciál; C<sub>in</sub> és C<sub>ex</sub>: intra- és extracelluláris K<sup>+</sup> koncentráció. Az ábrázolt TASK-3 áramokat (*piros*) a feszültséglépések kezdete után 2.4 ms-mal mértem, később (50 ms) ehhez még egy kisebb feszültségfüggő TASK-3 áram komponens is hozzáadódott, ez az illesztést a GHK áram egyenlettel pontatlanabbá tette. Módosítva a [28] közleményből.

membránpotenciál változásait. (Ezt szokás úgy is fogalmazni, hogy a csatorna működése "idő független" ("time independent") [27], vagy hogy a csatornának nincs aktivációs, deaktivációs és inaktivációs kinetikája [43].) A feszültségfüggő K<sup>+</sup> csatornák (K<sub>v</sub>) konformációs átrendeződést mutatnak a membránpotenciál változás hatására a ms-os időskálán és ez megváltoztatja a nyitási valószínűségüket. Ezzel éles ellentétben, az idealizált K<sub>2P</sub> csatornák áramának nagysága csak a K<sup>+</sup>-ra vonatkozó elektrokémiai gradiens (hajtóerő) változásától

függ, amely viszont a biológiai időskálán tekintve gyakorlatilag azonnali módon követi a membránpotenciál eltéréseit. Ebből következik, hogy feszültségzár (voltage clamp) kísérletben az ideális háttér  $K^+$  csatornák makroszkópos árama négyzögjelszerűen hűen követi a feszültséglépéseket.

Másik lényeges tulajdonsága az ideális háttér  $K^+$  csatornának, hogy nincs tényleges egyenirányító működése, vagyis nem jellemző rá rektifikáció. Megegyező nagyságú, egymással ellentétes irányú elektrokémiai gradiensek egyenlő nagyságú ellentétes irányú  $K^+$  áramokat hoznak létre. Ha a membrán két oldalán a töltéshordozó koncentrációja megegyezik, akkor a feszültség-áram összefüggés egy origón átmenő egyenes (ld. 7. ábra, 80 mM  $[K^+]$ ). A fiziológiás  $K^+$  koncentrációk esetén megfigyelhető látszólagos rektifikáció kizárólag amiatt jelentkezik, mert a membrán két oldalán eltérő a  $[K^+]$  (hasonlóan a 7. ábra 2 mM  $[K^+]$  görbéjéhez). Ha a membrán egyik oldalán nagyon alacsony a töltéshordozó koncentrációja, akkor a függvény a vízszintes tengely egyik irányában a tengelyhez közelít, hiszen erről a töltéshordozóban szegény oldalról nem folyhat számottevő áram a membránon keresztül egyik membránpotenciál értéken sem. Az eltérő  $K^+$  koncentrációk miatt fellépő látszólagos egyenirányítást szokás nyitott csatorna rektifikációnak ("open rectification") is nevezni [44].

Ha egy kálium áram hozzávetőlegesen teljesíti a fenti kritériumokat, akkor háttér  $K^+$  áramnak lehet tekinteni. A valódi  $K_{2P}$  csatornák árama nem teljesíti a feltételeket tökéletesen, azonban a nagy kálium csatorna családok ( $K_v$ ,  $K_{IR}$ ,  $K_{2P}$ ) közül messze a legjobban közelíti azokat. Számos oka van, hogy a  $K_{2P}$  csatornák árama eltéréseket mutat a GHK áram egyenlet által jósolt eredménytől. A kálium csatornák pórusa nem teljesíti a GHK elmélet egyik előfeltételét, miszerint az ionok átjutása a csatornán egymástól független, mivel a csatornák pórusában valójában egyszerre egynél több kötött ion is lehet, amelyek elektrosztatikus interakcióba kerülnek ("multi-ion pore") [45].

Egyes  $K_{2P}$  csatornák (pl. TREK-1 vagy TASK-3) emellett kimérhető mértékű feszültségfüggést mutatnak [46,47]. Megnyilvánulhat ez a makroszkópos áram aktivációs kinetikát mutató komponensében depolarizáló feszültséglépést követően, illetve ezzel ekvivalens módon megfigyelhető a

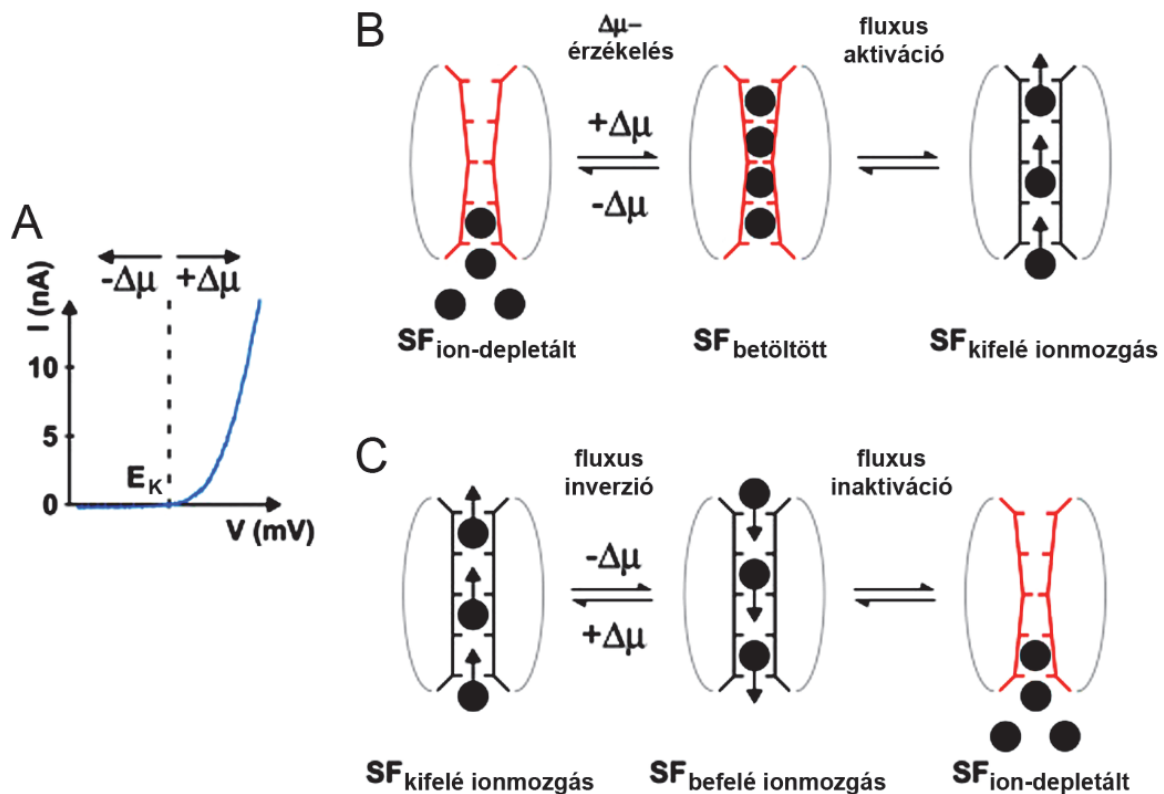
nyitási valószínűség növekedése depolarizáció hatására az egyedi csatorna (single channel) mérésekben.

Például a TREK-1 esetében a depolarizáció miatti aktiváció olyan gyors ( $\tau \approx 4-6$  ms) [47], hogy ha a makroszkópos áram mérése során a feszültségzár (voltage clamp) nem elég hatékony, akkor a nagyobb kifelé irányuló áram miatt a jelenség kifelé rektifikációnak tűnhet. A TREK-1 áramát az első közleményben kifelé rektifikáló áramként írták le [41]. A GHK egyenlet által jósolt nyitott csatorna rektifikációnál nagyobb mértékű kifelé egyenirányításért legalább két mechanizmus felelős. A befelé irányuló áramot gátolják az extracelluláris divalens kationok ( $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$ ), és ez tényleges kifelé rektifikációt okoz, amely megnyilvánul az egyedi csatorna áram mérése során is [48,49]. A másik része a látszólagos kifelé egyenirányításnak divalens kationok hiányában is jelentkezik és ez valószínűleg a gyors feszültségfüggő aktiváció miatt jön létre. Ez a mechanizmus az egyedi csatorna vezetőképességet nem változtatja, hanem a depolarizáció következtében kialakuló nagyobb nyitási valószínűségen alapul [47].

Érdekes módon a feszültségfüggő TREK-1 áram komponens bizonyos körülmények között megjelenik, míg más körülmények között az áram jobban közelíti a GHK egyenlet által jósolt nyitott csatorna rektifikációt. Azok a tényezők, amelyek befolyásolják, hogy a TREK-1 áram erősen kifelé rektifikáló jellegű mutat vagy háttér  $\text{K}^+$  áramnak felel meg, nagyon szerteágazóak és egyértelműen összefüggnek a csatorna komplikált szabályozásával. Háttér  $\text{K}^+$  áram jellegű okozhat a csatorna defoszforilációja [50], a csatornát aktiváló arachidonsav ( $10 \mu\text{M}$ ) [51], vagy kloroform ( $5 \text{ mM}$ ) [48], a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát ( $\text{PIP}_2$ ) kötődése a csatornához, az intracelluláris pH csökkenés, a membránfeszültség fokozódása [52], vagy pl. az AKAP150 interakciós fehérje kötődése [53]. Közös tulajdonsága ezeknek a szabályozó tényezőknek, hogy fokozzák a csatorna aktivitást és a hatásukat a TREK-1 C-terminális régióján keresztül fejtik ki. A C-terminális régió delécioja megszünteti a feszültségfüggő áram komponensét [47].

Joggal felmerül a kérdés, hogy milyen módon jöhet létre a  $\text{K}_{2\text{P}}$  csatornák feszültségfüggő aktivációja, hiszen ezek nem tartalmazzák a feszültségfüggő  $\text{K}_v$

csatornák S4 szegmentumához [54] hasonló feszültségérzékelő elemet. Ennek magyarázatára dolgozták ki az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás elméletét (8. ábra) [55].



**8. ábra: Az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás mechanizmusa.**

**A.** A  $K_{2P}$  csatornák makroszkópos áramának (kék görbe) függése a membránpotenciál és a  $K^+$  egyensúlyi potenciál ( $E_K$ ) értékétől, kivágott "belsejét kifordított" membrán foltban (excised inside-out membrane patch). **B.** Az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás aktivációs mechanizmusának bemutatása. Az egyensúlyi potenciálnál ( $E_K$ ) negatívabb membránpotenciál értéken a szelektivitási filter (SF) kis valószínűséggel tartalmaz  $K^+$  ionokat, depletált állapotban van, az SF kevésbé vezető konformációt vesz fel és a csatorna csak kis befelé irányuló áramot vezet ( $SF_{ion-depletált}$ ). Amikor a membránpotenciál az  $E_K$  értékénél pozitívabbá válik, akkor az elektrokémiai potenciál változás ( $\Delta\mu$ ) hatására a pórus  $K^+$  kötőhelyei telítődnek, azonban a csatorna még nem kerül nagy vezetőképességű állapotba ( $SF_{betöltött}$ ). A kötőhelyek telítődése konformáció változást hoz létre és ez teszi lehetővé a nagymértékű kifelé irányuló ionmozgást a póruson keresztül ( $SF_{kifelé ionmozgás}$ ). A feszültségfüggő aktiváció időállandója a konformációváltozás kinetikáját tükrözi. **C.** Az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás deaktivációs mechanizmusának bemutatása. Ha az aktivált, nagy kifelé irányuló áramot vezető csatorna működése közben ( $SF_{kifelé ionmozgás}$ ) a membránpotenciál hirtelen az  $E_K$  érték alá csökken, akkor létrejön egy gyors áramirány változás ("fluxus inverzió",  $SF_{befelé ionmozgás}$ ). Ez a befelé irányuló áram egy gyorsan deaktiválódó áram komponenst ("tail current") hoz létre. Az áram gyorsan lecseng, mert a pórus  $K^+$  kötőhelyei kiürülnek, és a csatorna visszatér a nem (kevésbé) vezető állapotába ( $SF_{ion-depletált}$ ). Módosítva a [55] közleményből.

Az ion-fluxus-kapcsolt kapuzási mechanizmusban a feszültségfüggéshez szükséges töltéseket a transzmembrán elektromos térben maguk a vezetett ionok biztosítják. A mechanizmus a csatorna szelepszzerű működését eredményezi. Ha a  $K^+$  ionok befelé vándorolnak a póruson keresztül, akkor ez a szelektivitási filter kötőhelyeinek kiürülését, majd a pórus összezáródását okozza. Ezzel szemben a kifelé irányuló  $K^+$  áramlás a szelektivitási filter kötőhelyeit telíti és a pórus fenntartott nyitott állapotát biztosítja.

Az ion-fluxus-kapcsolt kapuzást a TWIK-1 csatorna kivételével az összes többi vizsgált  $K_{2P}$  csatornánál (TREK-1, TREK-2, TRAAK, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TALK-2, TRESK) megfigyelték kivágott membrán foltban [55]. A TREK alcsaládba tartozó csatornáknál a makroszkópos áram sok esetben egyértelmű (látszólagos, GHK elmélet által nem magyarázható) kifelé rektifikálást mutat, jó összhangban az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás elmélettel. Ezzel szemben viszont egyes további, a fenti felsorolásban is szereplő csatornáknál sokszor nem annyira nyilvánvaló a kifelé rektifikálás. Habár a kivágott membrán foltban a TASK-1 csatornánál mintegy 8-szoros rektifikációs koefficiens közöltek az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás vizsgálata kapcsán [55], saját és mások korábbi teljes sejt (whole cell) méréseiben nem volt ilyen mértékben nagyobb a kifelé irányuló áram a befelé irányulónál. Ha magas extracelluláris  $K^+$  koncentrációjú oldatban a  $K^+$  egyensúlyi potenciál 0 mV (szimmetrikus  $[K^+]$ ), akkor a TASK-1 feszültség-áram összefüggése jó közelítéssel egy origón átmenő egyenes teljes sejtes rendszerekben [43,56]. Ez arra utal, hogy a TASK-1 inkább háttér  $K^+$  csatornaként működik a teljes sejt körülmények között és ilyenkor kevésbé jellemző rá az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás. Emiatt pl. a TASK-1 csatorna esetén az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás fiziológias jelentőségének megítélésére további tanulmányok szükségesek. Ahogy azt a TREK-1 csatorna részletes vizsgálata sugallja, valószínűleg a többi  $K_{2P}$  csatorna is működhet a körülményektől függően háttér  $K^+$  csatorna vagy ion-fluxus-kapcsolt kapuzó üzemmódban.

### 2.1.5 Szabályozási mechanizmusok

A  $K_{2P}$  csatornák aktivitását számos fizikokémiai paraméter befolyásolja (ld. 9. és 10. ábra). Egyes esetekben a különleges érzékenység miatt a csatorna élettani szempontból jelentős szenzor funkciót tölt be. Fontos azonban leszögezni, hogy a szabályozási mechanizmusok általában az egyes  $K_{2P}$  alcsaládokra vagy akár csak az adott csatorna típusra specifikusak, tehát ennek megfelelően semmiképp nem tárgyalhatók általánosan az összes csatornára vonatkozóan.

A TASK-1 és TASK-3 csatornák érzékenyek az extracelluláris pH változására, a savanyodás gátolja őket, innen adódik az elnevezésük (Twik-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channel). Több más  $K^+$  csatorna típust is gátol az EC savanyodás, azonban sokkal kisebb mértékben, tágabb tartományban, illetve lényegesen alacsonyabb pH értékeken, mint a TASK-1 csatornát. A erősen pH-függő TASK-1 áram maximumának 90 %-a mérhető pH 7.7-en, viszont az áramnak csak 10 %-a marad meg pH 6.7-en [43]. A TASK-3 is hasonlóan erős pH-függést mutat, azonban az érzékenységi tartománya savasabb irányba tolt, mint a TASK-1 csatornáé [46,57]. A TASK-1 és TASK-3 nagyfokú pH érzékenységét egy extracelluláris elhelyezkedésű hisztidin oldallánc protonálódása okozza [46,58]. A TASK alcsalád harmadik tagját, a TASK-5 csatornát, eddig nem sikerült funkcionálisan kifejezni, annak ellenére, hogy a csatorna mRNS-e egyértelműen jelen van bizonyos idegrendszeri struktúrákban, pl. a hallórendszer központi idegrendszeri pályáiban [59-62].

A TALK (Twik-related Alkaline pH-activated K<sup>+</sup> channel) alcsalád tagjai az EC pH növekedésére aktiválódnak, pH 7.4-en aránylag kis áramot vezetnek. A TALK alcsaládba tartozik a TASK-2 csatorna, amelynek a pH 6.5-8.8 tartományban változik az árama 10 és 90 % között [63]. A TASK-2 csatorna extracelluláris pH érzékelő mechanizmusa eltér a TASK alcsalád tagjaiétól. Egy a szelektivitási filterhez közeli, különleges fehérje környezetben elhelyezkedő, megváltozott pK értékű arginin protonálódása közvetlen elektrosztatikus hatással akadályozza a  $K^+$  mozgást a póruson keresztül [64]. A TALK-1 csatornában ugyanebben a pozícióban szintén arginin, a TALK-2-ben pedig

lizin található, ezek a bázikus aminosavak hasonló szerepet játszanak a pH érzékelésben, mint a TASK-2-ben. Eltérően a TASK alcsalád tagjaitól, a TASK-2 csatornát az intracelluláris pH is szabályozza, a citoplazma alkalinizálódása aktivál. Ezért más mechanizmus felelős, mint az EC pH érzékelésért [65,66]. A TALK-1 és TALK-2 csatornák még bázikusabb pH-n aktiválódnak, mint a TASK-2. A fiziológias pH 7.4 értéken gyakorlatilag nem vezetnek áramot és az áram csak pH 10 fölött éri el a maximumát [67,68].

Részletesen vizsgálták a TREK alcsalád intracelluláris pH függését. Az intracelluláris savanyodás aktiválja a TREK-1 és TREK-2 csatornákat [69-71], míg a bázikus pH serkenti a TRAAK-ot, de a savanyítás nem hat rá [49]. A TREK-1 és -2 csatornákat az IC savanyodás nem csak aktiválja, de érzékenyíti a mechanikai ingerekre, illetve kivédi a  $G_s$  jelátviteli út gátló hatását (ld. alább). Az IC pH változás a csatorna proximális C-terminálisában található glutamaton keresztül hat [70-72]. A TRAAK C-terminálisának helyettesítése a TREK-1 csatornáéval átvitte az IC savanyítás aktiváló hatását a kimérára, amelynek transzmembrán régiói és pórusdoménjai a TRAAK-ból származtak [71]. Ez meggyőzően mutatja a C-terminális döntő jelentőségét a TREK csatornák intracelluláris pH általi szabályozásában. A TREK-1 és TREK-2 áramát az extracelluláris pH csökkenése ellentétes irányban változtatja [73].

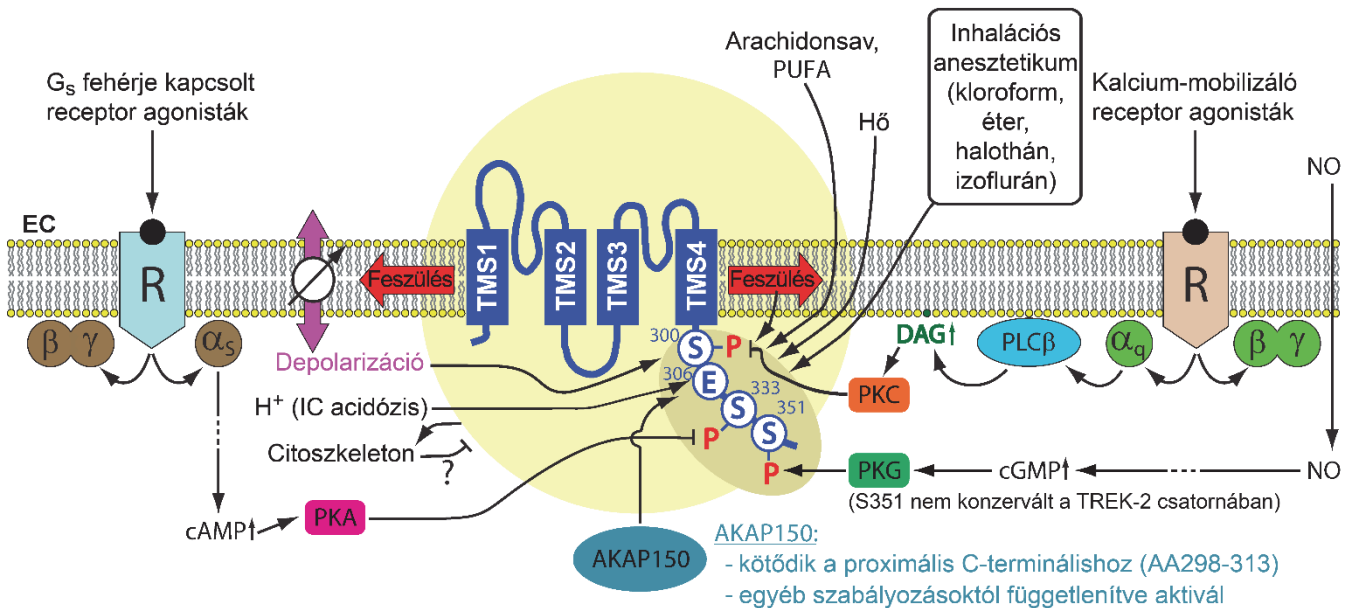
A TREK alcsalád tagjai mechanoszenzitív csatornák [48,69,71,74,75]. A csatornák érzékenysége a membránfeszülésre megnyilvánul kivágott membrán folton végzett patch clamp mérésben, amikor a pipettaoldalát nyomását változtatják. Az extracelluláris oldal irányából létrehozott negatív (szubatmoszférás, pl. -40 Hgmm) nyomás erős ingere a csatornáknak, míg a pozitív nyomás csak kevéssé (TREK-1 és TREK-2) vagy nem (TRAAK) aktivál [48,49,69,76]. A membránra ható nyíróerő, az ozmotikus hatásra megváltozó sejtmembrán feszülés, vagy a membrángörbületet befolyásoló anyagok is hatékony mechanikai ingerek a TREK alcsalád tagjaira [48,51,76]. Ahogy a kivágott membrán foltokban végzett kísérletek is mutatják, a citoszkeleton kapcsolata a csatornákkal nem szükséges feltétlenül a mechanoszenzitivitáshoz, habár teljes sejt rendszerben módosíthatja az érzékenységet a mechanikai ingerekre [49,77]. Több vizsgálat is alátámasztja,

hogy a lipid kettősréteg feszülése közvetlenül befolyásolja a TREK csatornák működését és ez a mechanoszenzitivitás oka [78-80].

A TREK alcsalád tagjait aktiválják a többszörösen telítetlen zsírsavak és a lizofoszfolipidek [48,51,69,81]. A TRAAK csatornát ez alapján nevezték el (TWIK-Related Arachidonic Acid-activated  $K^+$  channel) [81]. Az arachidonsav (10  $\mu$ M) mellett más többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA, polyunsaturated fatty acids) is jelentősen növelik a TREK csatornák áramát, azonban a zsírsavak telített megfelelői nem aktiválnak [69,74,81,82]. Hasonlóan az IC savanyodáshoz, a PUFA is fokozza a csatornák mechanikai érzékenységét és kivédi a protein kináz A általi gátlásukat. Ez jól mutatja, hogy az eltérő fizikokémiai és jelátviteli tényezők által elindított csatorna szabályozó folyamatok összefonódnak. A PUFA hatásához is szükséges a csatorna C-terminálisának jelenléte [48,70]. Az arachidonsav kivágott membrán foltban a membrán mindkét oldaláról hatékony (belülről gyorsabban növeli az áramot) [49,74,81]. Emiatt valószínű, hogy a PUFA közvetlenül a csatornafehérjét befolyásolja a celluláris integritástól függetlenül. A lizofoszfolipidek a telítetlen zsírsavaktól eltérő mechanizmussal növelik a TREK áramot. Intakt sejtben hatékonyak, azonban kivágott foltban nem jön létre a hatásuk [51,69].

A TREK csatornák árama meredeken növekszik a hőmérséklet függvényében a fiziológiásan releváns tartományban [83-86]. A hőmérséklet emelkedése 10 °C-onként körülbelül 7-14-szeres áram növekedést eredményez a 24 és 37 °C közötti tartományban ( $Q_{10} \approx 7-14$ ) [83,84]. Összehasonlításképpen, a kevésbé hőmérséklet-érzékeny TASK-1 csatornánál  $Q_{10} \approx 2$  [83,84], az ismert termoreceptor szerepű TRP csatornáknál pedig jellemzően  $Q_{10} \approx 20$  [87]. Úgy tűnik, hogy a TREK alcsaládba tartozó csatornák hőmérsékletfüggésének jelentősége van a fiziológiai hőmérséklet érzékelés szabályozásában [85,86], a periférián a vegetatív és szomatikus afferensekben [88-90] és talán a központi idegrendszerben a hypothalamus hőmérséklet érzékeny területein is [91]. Eltérően a fent tárgyalt IC pH, PUFA és mechanikai hatásoktól, a  $K_{2P}$  csatornák hőmérsékletfüggése elvész a membránfolt kivágásakor. Ez arra utal, hogy egy még ismeretlen citoplazma faktor vagy egyéb az élő sejtbe jellemző tényező szükséges a TREK csatornák hőmérsékletfüggő aktivációjához.

## TREK-1 és TREK-2



### 9. ábra: A TREK-1 és TREK-2 csatornák szabályozási mechanizmusai

A TREK csatornákat számos fizikokémiai tényező aktiválja, mint pl. a membránfeszülés, a depolarizáció, a hőmérséklet emelkedése vagy az intracelluláris acidózis. A többszörösen telítetlen zsírsavak (polyunsaturated fatty acids, PUFA), mint pl. az arachidonsav és számos párolgó folyadék anesztetikum szintén nyitja ezeket a csatornákat. A  $G_s$ /cAMP/PKA és  $G_q$ /PLC/DAG/PKC jelpályák egyaránt gátolják a  $K^+$  áramot, az ábrán jelölt C-terminálisban található szerin aminosavak foszforilációjával (a számozás a TREK-1 csatornának felel meg). A NO/cGMP/PKG jelpálya viszont aktiválja a TREK-1 csatornát, de nem hat a TREK-2-re. A TREK csatornák kapcsolata a citoszkeletonnal összetett, a citoszkeleton gátló hatást fejthet ki a TREK áramra, azonban a csatornák működése is visszahat a citoszkeleton változásaira [77]. Az AKAP 150 állványfehérje közvetlenül kapcsolódik a TREK-1 C-terminálisához a 298-313 aminosavak (AA) közötti régióban és aktiválja a  $K^+$  áramot, illetve az egyéb szabályozó faktorok iránt érzéketlen háttér (csurgó) árammá alakítja azt. (A nyilak aktivációt jelentenek, a T végződés pedig gátlást. A kérdőjel ismeretlen mechanizmust jelez.) Módosítva a [28] közleményből.

A  $K_{2P}$  csatornákat nemcsak a fizikokémiai tényezők befolyásolják, hanem intracelluláris jelátviteli utak is regulálják. Számos sejttípusban a háttér  $K^+$  konduktancia szabályozása meghatározza a membránpotenciál változásait és ezáltal döntően kihat a sejt élettani működésére. Különös jelentőségüknek megfelelően, több munkacsoport is gondosan tanulmányozta ezeket a jelátviteli folyamatokat. Elsősorban a TREK, TASK és TRESK alcsaládok viszonylatában ismertek olyan jelpályák, amelyek a csatorna aktivitást sokszorosára vagy törtrészére tudják változtatni [92].

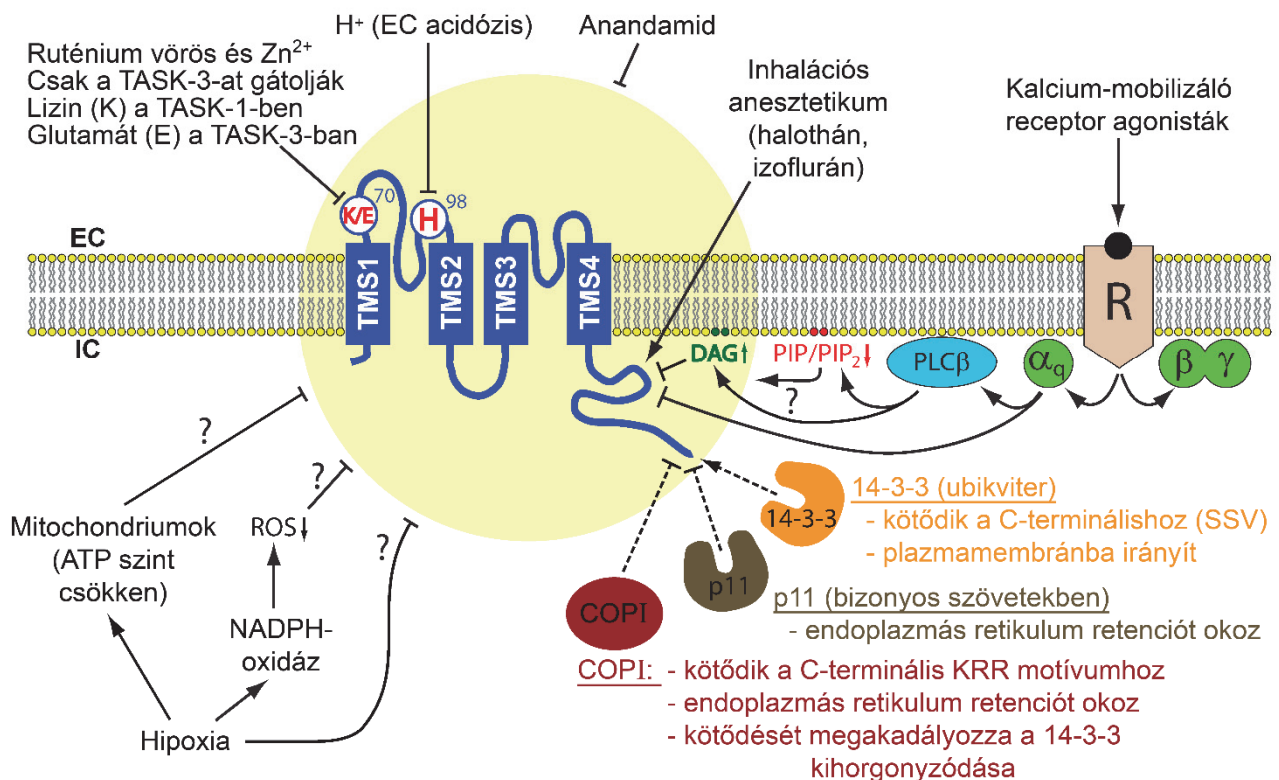
A TREK-1 és TREK-2 csatornákat a  $G_s$ - és  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptorok ingerlése gátolja [69,93,94]. A  $G_s$  jelpályán a gátlást a [cAMP] emelkedés miatti protein kináz A (PKA) aktiváció, a  $G_q$  útvonalon pedig a foszfolipáz C hatására keletkező diacilglicerín (DAG) és kalcium jel által aktivált protein kináz C (PKC) hozza létre. A PKA és PKC közvetlenül foszforilálják az intracelluláris C-terminális régió egyes szerin aminosavait és ezzel a mechanizmussal csökkentik a csatorna aktivitást. Ugyanezeket a szerineket az AMP-függő kináz (AMPK) is foszforilálja, ezáltal bizonyos sejtípusokban elvileg az ATP bomlás során megnövekvő AMP koncentráció, vagyis a sejt metabolikus állapota befolyásolhatja a TREK áram nagyságát [95]. (A TRAAK aktivitást a PKA és a PKC nem szabályozza úgy, mint a TREK csatornákat [81]. A TRAAK áramát nem változtatja a  $G_q$ -kapcsolt receptorok ligandkötése [96].) A TREK-1 áramot serkenti a csatorna protein kináz G (PKG) általi foszforilációja. A PKG egy olyan szerin aminosavat foszforilál, amely a TREK-2 csatornában nem konzervált. Ezen a mechanizmuson keresztül a nitrogén-monoxid (NO) aktiválja a TREK-1 csatornát a gasztrointesztinális rendszerben a simaizom sejtek citoplazma [cGMP] emelkedésén keresztül [97,98], azonban a cerebrovaszkuláris simaizomban ez a hatás nem volt megfigyelhető [99].

A fehérje interakciók fontos szerepet játszanak a  $K_{2P}$  csatornák működésében, pl. a csatornák megfelelő lokalizációját biztosítják, a csatorna aktivitását módosítják, vagy közrejátszanak az összetett intracelluláris szabályozási mechanizmusokban. A TREK, TASK és TALK csatornák a citoplazmában található különböző fehérjékkel mutatnak interakciót.

A TREK csatornák interakciós partnerei a C-terminális régióban található szekvencia motívumokhoz kapcsolódnak. A TREK-1 csatornához kötődik az egyik protein kináz A-t kihorgonyozó állványfehérje, az AKAP150 (A-kinase anchoring protein 150). Egyrészt az állványfehérje kötődése fehérje-fehérje interakcióval közvetlenül aktiválja a TREK-1 csatornát. Másrészt, az AKAP150 asszociációja megváltoztatja a TREK-1 áram feszültségfüggését. A bazális körülmények között jellemző erősen kifelé rektifikáló jelleg megszűnik, és a TREK-1 háttér (leak)  $K^+$  csatornaként működik. Az AKAP150 emellett beleszól a csatorna szabályozásába is, az állványfehérje kapcsolódása miatt eleve is

aktivált TREK-1 árama már nem növelhető tovább mechanikai hatással vagy arachidonsavval [53]. A TREK-1 és TREK-2 C-terminálisához egy másik interakciós fehérje, a mikrotubulus-asszociált protein Mtap2 is kötődik. A kötőhelye a csatornában eltér az AKAP150-étől és ez az interakció nem befolyásolja a csatorna aktivitást, azonban fokozza a TREK-1 fehérje kijutását a plazmamembránba [100].

### TASK-1 és TASK-3



#### 10. ábra: A TASK-1 és TASK-3 csatornák szabályozási mechanizmusai

A csatornákat gátolja az extracelluláris savanyodás az első extracelluláris hurokban található hisztidin 98 (H98) protonálódása miatt. A kalcium-mobilizáló,  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptorok aktiválódása erőteljes TASK gátlást okoz, a foszfolipáz C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) enzimreakció következtében, a plazmamembránban felhalmozódó diacilglicerin (DAG) közvetítésével. Vitatott, hogy a hatáshoz hozzájárul-e az  $\alpha_q$  fehérje közvetlen kötődése a csatornához, illetve a membrán foszfatidil-inozitol-4(,5)-biszfoszfát PIP $_2$  deplécio. Bizonyos sejttípusokban a hipoxia ismeretlen mechanizmussal gátol. Az inhalációs anesztetikumok egyes típusai aktiválnak (az éter és kloroform nem). Az anandamid nem specifikus TASK gátlószer. A polikation ruténium vörös és a cink ( $Zn^{2+}$ ) a TASK-3-at gátolják, de a TASK-1-et nem, mivel a TASK-3-ra specifikus negatív töltésű glutamát 70 (E70) aminosavhoz kötődnek. A koatomer protein COPI endoplazmás retikulum retenciót okoz, ezt akadályozza meg a 14-3-3 adapter fehérje kötése. A p11 közvetett módon okoz retenciót az endoplazmás retikulumban. (A nyilak aktivációt, a T végződés gátlást, a kérdőjelek ismeretlen mechanizmust jelentenek. A szaggatott vonalak a membránba kihelyeződés változását jelölik.) Módosítva a [28] közleményből.

A TASK-1 és TASK-3 C-terminális utolsó öt aminosavához (RRSSV a TASK-1 csatornában) kötődik a 14-3-3 adapter fehérje [101-104]. A 14-3-3 kötődése maszkolja a csatornák endoplazmás retikulum retenciós szignálját, emiatt a koatomer protein COPI nem tud kötődni és a pórusképző alegység a plazmamembránba irányítódik. A TASK csatornák C-terminálisa emellett még interakciót mutat a p11 (S100A10) adapter proteinnel [105,106] és a syntaxin-8 fehérjével [107], amelyek különböző mechanizmussal okoznak endoplazmatikus retikulum retenciót és csökkentik a csatorna expressziót [104].

A TALK alcsaládba tartozó TASK-2 csatornához is kötődik a 14-3-3 fehérje, azonban nem a C-terminális legvégéhez, hanem egy annál proximálisabb C-terminális régióhoz, egy nem klasszikus típusú kötőhelyen keresztül. A 14-3-3 kötődése a TASK-2-höz mérsékelten fokozza a csatorna mennyiséget a plazmamembránban [108]. Heterolog expressziós rendszerben leírták, hogy a heterotrimer G fehérjék  $\beta\gamma$  alegysége is kötődik a TASK-2 csatornához, azonban ennek élettani jelentősége további megerősítésre vár, hiszen a csatorna receptor-mediált szabályozását nem mutatták ki [109].

## 2.1.6 Élettani és orvosi jelentőség

A feszültségfüggő  $K^+$  csatornák (a  $K_v$  család tagjai) repolarizálnak, vagyis az aktivációs folyamatok (pl. akciós potenciál) miatt pozitívabb membránpotenciált visszatérítik a nyugalmi negatív érték irányába. A befelé rektifikáló  $K^+$  csatornák (a  $K_{IR}$  család tagjai) a nyugalmi membránpotenciál fenntartásához járulnak hozzá, mivel negatív feszültség értékeken vezetnek nagy áramot. A háttér  $K^+$  csatornák (a  $K_{2P}$  család tagjai) viszont mindkét hatást kifejtik a membránpotenciáltól kevésbé függő működésük miatt, stabilizálják a negatív nyugalmi membránpotenciált és erőteljes repolarizációt is létrehozhatnak.

A  $K_{2P}$  csatornák élettani jelentőségének átfogó tárgyalása meghaladja a jelen értekezés kereteit. Az elmúlt húsz év intenzív vizsgálatainak eredményeként több mint 1000 közlemény jelent meg a  $K_{2P}$  csatornákról. Több próbálkozás is történt a csatornák élettani jelentőségének összefoglalására. Mindenképpen érdemes megemlíteni a *Pflügers Archiv (European Journal of*

*Physiology*) folyóirat különkiadványában megjelent közlemény sorozatot, amely 19 összefoglaló és néhány eredeti munkát is tartalmaz és több mint 250 oldalon tárgyalja a  $K_{2P}$  csatornák jelentőségét (*Pflügers Archiv*, 2015, 467(5):865-1142, bevezetőt ld. [110]). Korábban munkacsoportunk és később mások is közöltek általános összefoglalót a  $K_{2P}$  csatornák működéséről és élettani szerepéről [28,111]. Az értekezésben alább csak néhány általam különösen érdekesnek ítélt kiragadott példán keresztül adok szemelvényeket a  $K_{2P}$  csatornák élettani és orvosi jelentőségéről.

#### **2.1.6.1 A $K_{2P}$ csatornák jelentősége az általános anesztéziában**

A TASK és TREK csatornák kiterjedten expresszálnak a központi idegrendszerben és fontos szerepet játszanak az idegsejtek ingerlékenységének csökkentésében. A műtéti érzéstelenítésben gyakran használt inhalációs anesztetikumok hatásukat jelentős részben a  $K_{2P}$  csatornák aktiválásán keresztül fejtik ki. A  $K_{2P}$  csatornák áramának növelése hiperpolarizálja az idegsejteket, ez hozzájárulhat az általános anesztézia során jelentkező tudatvesztéssel járó, csökkent ingerelhetőségű, fájdalomcsillapító, altató, izomrelaxáns és mérészkelt autonóm reakciókkal jellemezhető hatások kialakulásához. A halothán és izoflurán az altatásnál használt koncentrációban erőteljesen növeli a TREK-1, TREK-2, TASK-1, TASK-3 és TRESK áramát [69,112-117]. A sebészi anesztézia történelmi korszakában használt kloroform és dietil-éter is aktiválja a TREK-1 csatornát 1 mM-os, vagy az alatti koncentrációban [112], illetve a kloroform hasonló hatását kimutatták a TREK-2 csatornára is [69]. A TREK-1 és TRAAK csatornát emellett aktiválja még a klorálhidrát aktív származéka [118], illetve a TREK-1 csatornát a gázanesztetikum  $N_2O$ , xenon és ciklopropán is [119], amelyek a halothánnal vagy izofluránnal létrehozott anesztéziában szintén fontos  $GABA_A$  receptorra nem hatnak [120]. Néhány  $K_{2P}$  csatorna típust (TWIK-1, TRAAK és TALK csatornák) lényegében nem befolyásolnak az inhalációs anesztetikumok [67,112], a THIK alcsalád tagjai pedig a halothán általi gátlásról kapták a nevüket (Tandem pore domain in a Halothane-Inhibited K<sup>+</sup> channel) [121].

A TREK-1 génhiányos egérben a kloroform, halothán, sevoflurán és dezoflurán anesztetikus hatása jóval gyengébb, mint a vad típusú állatokban [122]. Az altató hatás később jelentkezik, és a fájdalmas ingerre adott motoros válasz megszüntetéséhez szükséges minimális alveoláris koncentráció (MAC) is nagyobb. A hatás nem a TREK-1 hiányában jelentkező általános hiperexcitabilitás következménye, mert a pentobarbitál – amely a GABA<sub>A</sub> receptoron keresztül hat, de nem befolyásolja a K<sub>2P</sub> csatornákat – hasonlóan hatékony a TREK-1<sup>-/-</sup> és vad típusú állatokban [122]. A TREK-1 hiányában a halothán kevésbé gátolja a preszinaptikus glutamát felszabadulást a cerebrokortikális idegvégződésekben [123]. A TREK-1<sup>-/-</sup> állatokhoz hasonlóan, a TASK-1, TASK-3 és TASK-1/3 dupla génhiányos egerekben szintén csökkentek a halothán és izoflurán anesztetikum hatások [116,124-126]. A TASK csatornák szelektív eltávolítása a kolinerg neuronokból (kondicionális génhiányos egér) ugyanúgy csökkentette a halothán immobilizáló és szedatív hatását, mint a TASK csatornák eliminációja a teljes állatban [116]. Az immobilizációhoz a TASK csatornák aktivációjának hatására létrejövő gerincvelői motoneuron hiperpolarizáció járul hozzá, amíg a halothán szedatív hatásában minden bizonnyal magasabb szintű központi idegrendszeri (pl. hídi vagy előagyi) kolinerg neuronok csökkent aktivitása szerepel. További részletekért a K<sub>2P</sub> csatornák jelentőségéről az anesztéziában ld. a [115,127-129] összefoglalókat.

#### **2.1.6.2 A TREK-1 az antidepresszáns kezelés potenciális célpontja**

A TREK-1 csatorna, általános neuron hiperpolarizáló működése egyik elemeként, kiemelt fontosságú azokban az idegrendszeri struktúrákban, amelyek meghatározzák a viselkedés és kedélyállapot alakulását. A TREK-1 gén hiánya egérben depresszió-rezisztens fenotípust eredményez [130]. A TREK-1<sup>-/-</sup> egerek az antidepresszáns gyógyszerek vizsgálatára kidolgozott öt különböző standard tesztben lényegében úgy teljesítenek, mint a vad típusú állatok hatékony antidepresszáns kezelést (pl. fluoxetin adását) követően. Pl. az egeret vízzel telt tartályba helyezve az átmeneti immobilitás időtartama – ez talán leginkább az emberi kétségbeesésnek felelhet meg – jelentősen lerövidül a TREK-1<sup>-/-</sup> állatban. A TREK-1 kifejeződik a dorzális raphe magokban és a

génhiányos állatban a szerotoninerg neuronok aktivitása fokozott. A szerotonin szintézis és visszavétel együttes akut gátlásával a neuronokban létrehozott teljes szerotonin depléción megszünteti a depresszió-rezisztens fenotípust a TREK-1<sup>-/-</sup> állatban [130]. Ez arra utal, hogy a TREK-1 hiánya a szerotonin neurotranszmisszió módosításán keresztül fejt ki a hatását elsősorban. Emberben kapcsolságot mutattak ki a TREK-1 genetikai variánsai és a depressziós megbetegedésre való fogékonyság, illetve az antidepresszáns kezelésre adott válaszkészség között [131,132].

A fluoxetin a szerotonin visszavételt gátló antidepresszáns gyógyszerek csoportjába (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) tartozik és a visszavétel gátlása miatt a szinaptikus részben megemelkedő szerotonin koncentráció minden bizonnyal hozzájárul a terápiás hatásához. Emellett azonban a fluoxetin, illetve főként annak aktív metabolitja a norfluoxetin, hatékonyan gátolja a TREK-1 csatornát. A norfluoxetin félmaximális TREK-1 gátló koncentrációja ( $IC_{50} = 9 \mu M$ ) a terápiás koncentráció tartományba esik [133]. Emiatt nagyon valószínű, hogy a TREK-1 csatorna gátlása a fluoxetin alkalmazásakor szintén részt vesz a terápiás hatás kialakításában. Az SSRI gyógyszerek közül nem csak a fluoxetin gátolja a TREK-1 csatornát, hanem a paroxetin, sertralin és fluvoxamin is, hasonlóan alacsony  $IC_{50}$  értékekkel [130]. A TREK-1 mRNS-ről alternatív transzláció iniciációval kétféle polipeptid változat íródik át [134,135]. Mindkét változat működik (eltérő az egyedi csatorna vezetőképességük) és nagy különbséget mutatnak a fluoxetin érzékenységükben [136]. A TREK-1 fehérje és a norfluoxetin komplexének kristályszerkezetét meghatározták [37]. A norfluoxetin molekula a TREK-1 csatorna intramembrán részében található fenesztrációba kötődik és ezáltal stabilizálja a csatorna zárt konformációját. Ez az eredmény jó összhangban van a TREK alcsalád egy alternatív kapuzási modelljével (melyet az *Elektrofiziológiai tulajdonságok* fejezetben (2.1.4) nem ismertettem). Eszerint a csatornák zárt állapota úgy jön létre, hogy a hidrofób intramembrán térben, a transzmembrán hélixek között, egy fenesztráció nyílik, amely a pórus tengelyéhez vezet a szelektivitási filter alatti területre. Ebbe az oldalirányú

nyílásba dugattyú módjára zsírsavlánc hatolhat a membránt alkotó lipidekből és ez zárja a csatorna pórusát [35,38].

A fent bemutatott eredményekből következik, hogy a TREK-1 csatorna gátlása várhatóan antidepresszáns hatású. Ennek megfelelően intenzív erőfeszítések történtek a TREK-1 csatornát gátló antidepresszáns hatóanyagok kifejlesztésére. Ezen a területen előrelépést jelentett annak felfedezése, hogy a neurotensin receptor 3 (NTSR3/sortilin) fehérje proteolitikus hasadásából keletkező szekretált peptid egyik fragmensének megfelelő szintetikus analóg, a spadin gátolja a TREK-1 csatornát [137]. A spadin a TREK-1 áram közvetlen gátlásán kívül egyben fokozza a csatorna internalizációját is. Rágcsáló modellben a spadinnal történő kezelés már négy nap alatt antidepresszáns hatást fejt ki, amelynek gyakorlatilag minden jellemzője megfelel a három-négy hetes fluoxetin kezeléssel elért változásoknak, beleértve a CREB foszforilációt és hippocampalis neurogenezist [137]. Állatkísérletes modellben a spadin antidepresszáns hatása fennmarad három hetes kezelés után is [138]. A spadinnak csekély az *in vivo* stabilitása és maximálisan 7 óra a hatástartama. Folyamatos próbálkozások történnek a spadin szerkezetének optimalizálására. A rövidebb spadin analógokat ("mini-spadin") erősebb TREK-1 gátló hatás, meghosszabbodott hatástartam és jobb biohasznosulás jellemzi (ld. a [139] összefoglalót).

A sortilin/sortilin-eredetű propeptid rendszer a TREK-1 endogén regulátora lehet és a rendszer komponenseinek változását vizsgálni kezdték depressziós betegekben. A szolubilis sortilin [140,141] és a sortilin eredetű propeptid [142,143] szintje is szignifikánsan eltér a depressziós betegekben a normálistól. A sortilin eredetű propeptid szintje reagál a betegek antidepresszánsokkal történő sikeres kezelésére [142], illetve változik azokban a betegekben, akiknek állapota nem javult az antidepresszánsokra, de az elektrokonvulzív terápia hatásos volt náluk [143]. A sortilin eredetű propeptid potenciális biomarker a depressziós beteg állapotának megítélésére (ld. a [144] összefoglalót).

### 2.1.6.3 A TASK és TALK csatornák a kemoreceptorokban

A TASK és TALK alcsalád tagjai rendkívül érzékenyek az extracelluláris pH változására (ld. a 2.1.5 *Szabályozási mechanizmusok* fejezetet). Ezek a csatornák több szervben is pH-szenzor funkciót töltenek be. Mivel az extracelluláris savanyodás gátolja a háttér  $K^+$  áramukat, ezért az EC pH csökkenésére depolarizáció jön létre. A depolarizáció ingerelt állapotot és ezzel együtt gyakran fokozott neurotransmitter leadást eredményez a csatornákat kifejező sejtben.

A glomus caroticumban található perifériás kemoreceptor sejtekben döntő részben a TASK-1 és TASK-3 csatornák hozzák létre a háttér  $K^+$  áramot [145-149]. A extracelluláris pH csökkenés hatására a TASK csatornák gátlódnak, az 1-es típusú glomus sejtek depolarizálódnak, ez pedig feszültségfüggő kalcium csatornák nyílását, citoplazma  $[Ca^{2+}]$  növekedést és ezáltal fokozott transzmitter leadást okoz. Az egyik jelentős transzmitter az ATP, amely a szenzoros idegvégződés  $P_2X_2/P_2X_3$  purinerg receptoraira hat. A megnövekedett akciós potenciál frekvencia hatására a légzés fokozódik.

A perifériás kemoreceptorok legfontosabb ingere az oxigén parciális nyomás ( $pO_2$ ) csökkenése. A vérplazma savanyodására adott légzési válaszon kívül, a glomus sejtek TASK csatornái részt vesznek a  $pO_2$  csökkenés által kiváltott hatás közvetítésében is [145,148-150]. A hipoxia következtében gátlódik a glomus sejtek TASK árama, de ennek a folyamatnak a pontos mechanizmusa mind a mai napig nem tisztázott. A metabolikus hipotézis szerint hipoxiában mérséklődik az elektron transzport a mitokondriumokban, csökken a citoplazma ATP szintje és ez felelős a TASK gátlásért. Az 1-es típusú glomus sejtekből kivágott membrán foltban a TASK csatornák áramát az intracelluláris oldalról adott ATP növelni képes [151]. Az ATP azonban nem hat a heterolog rendszerekben kifejezett TASK csatornákra kivágott membrán foltban, ezért ezt a szabályozást egy glomus sejtre specifikus még ismeretlen faktor közvetíti. A glomus sejtek autokrin regulációja is hozzájárulhat a TASK gátláshoz hipoxiában. A hipoxia hatására a sejtekből adenosin szabadul fel [152], amely az  $A_{2A}$  adenosin receptoron keresztül,  $G_s$  fehérje aktiválódást, cAMP szint

emelkedést és a TASK csatornák protein kináz A (PKA) általi gátlását okozhatja [44,150].

Az orvosi gyakorlatban a légzés stimulálására használt doxapram (Dopram) a perifériás kemoreceptorok aktivitását fokozza. Ezt a hatást jelentős részben a TASK-1 és TASK-3 csatornák gátlásán keresztül hozza létre [153-156]. Ezzel szemben a glomusokban található TASK csatornák aktivációja hozzájárulhat a párolgó folyadék anesztetikumok légzésdepresszív hatásához, illetve az alkalmazásuk során a hipoxiára adott jellemzően csökkent válaszreakcióhoz [157,158].

A perifériás kemoreceptorok mellett a légzésszabályozás másik fontos eleme az agytörzsi centrális kemoreceptorok rendkívüli érzékenysége a széndioxid parciális nyomás ( $p\text{CO}_2$ ) változása iránt. A vérplazma  $p\text{CO}_2$  emelkedése a centrális kemoreceptor neuronok környezetében pH csökkenést eredményez a szénsav-bikarbonát pufferrendszer működése miatt, és a sejtek ténylegesen a lokális pH változására érzékenyek. Ebben az érzékelésben a TALK alcsaládba tartozó TASK-2 játszik fontos szerepet. A TASK-2 génhiányos egérben alacsony  $p\text{CO}_2$  mellett is hiperventilláció jelentkezik, mivel a centrális kemoreceptor nucleus retrotrapezoidus neuronok membránpotenciálját negatív értéken tartó TASK-2 háttér  $\text{K}^+$  áram hiányzik [159,160]. Ellentétben a TASK-2 génhiányos állattól, a TASK-1 génhiányos és TASK-1/TASK-3 dupla génhiányos egerekben ugyan a perifériás kemoreceptoron keresztül létrejövő hipoxiára adott válasz csökkent [161], de a centrális kemoreceptor  $p\text{CO}_2$  érzékenysége megtartott maradt [162]. A centrális kemoreceptorban a  $p\text{CO}_2$  érzékenyséért nem kizárólagosan a TASK-2 csatorna felelős. Ha a TASK-2 csatorna mellett a GPR4 proton-aktivált G-fehérje kapcsolt receptor gént is kiiktatták, akkor a  $p\text{CO}_2$  változásra adott légzési válasz lényegében megszűnt [163]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a létfontosságú légzésszabályozást több egymással párhuzamos mechanizmus biztosítja, melyek között a TASK és TALK csatornák pH-érzékelő funkciója kiemelt jelentőségű [164].

#### 2.1.6.4 A TASK-1 és a pulmonális hipertónia kapcsolata

A kisvérköri keringésben az artériás ellenállás szabályozása jelentősen különbözik a szisztémás keringésben jellemző mechanizmusoktól. Az egyik lényeges különbség, hogy eltérően a nagyvérköri keringéstől, a tüdőkeringésben a hipoxia vazokonstrikciót okoz. Ez biológiailag célszerű, mivel pl. a kórosan alacsony ventilációjú tüdőterületeken a hipoxia miatti vazokonstrikció csökkenti a keringést, és ez mérsékeli a súlyos következményekkel járó ventiláció/perfúzió (V/Q) aránytalanság kialakulását.

A hipoxiás vazokonstrikció elsősorban a tüdőartéria simaizomsejtek depolarizációja, és ennek hatására bekövetkező kontrakciója miatt alakul ki. A hipoxia következtében létrejövő depolarizáció egyik alapvető mechanizmusa a plazmamembrán  $K^+$  konduktancia csökkenése. Többféle  $K^+$  csatorna gátlása is hozzájárul ehhez a mechanizmushoz és nagy fajonkénti különbség van a releváns  $K^+$  csatorna típusokban. Emberben mai ismereteink szerint talán a legfontosabb a  $K_v1.5$  feszültségfüggő  $K^+$  csatorna [165,166] és TASK-1 háttér csatorna gátlása [167,168]. Egérben viszont a TASK-1 csatorna nem játszik szerepet a folyamatban [169-171]. Csakúgy, mint a perifériás kemoreceptorban, a hipoxia által okozott TASK-1 gátlás mechanizmusa nem ismert pontosan a pulmonális artéria simaizomsejtben sem. Az endothelin-1 bizonyos esetekben szerepet játszik a pulmonális hipertónia kialakulásában [172] és az endothelin-1 receptor ingerlés kifejezett TASK-1 gátló hatása hozzájárulhat az ennek hátterében álló generalizált pulmonális artériás vazokonstrikcióhoz [168,173].

A pulmonális artériás hipertenzió (PAH) egy rendkívül heterogén betegségcsoport, ahol nagyon eltérő kórokok váltják ki a kisvérköri vérnyomás emelkedést [174]. A PAH egy ritka formájáért, amely körülbelül az örökletes esetek 3%-át teszi ki, a TASK-1 csatorna heterozigóta inaktiváló mutációi felelősek [175-177]. Úgy tűnik tehát, hogy az esetek egy kis részében a PAH kifejezetten "csatornabetegség". A TASK-1 szabályozásának szerepe azonban szembeötlő a PAH patomechanizmusában általában véve is. A TASK-1 áramának változása tehát a betegek nagyobb hányadát érintheti, mint akikben a TASK-1 funkció genetikai okból deficiens. Emiatt jelenleg nagy az érdeklődés

az iránt, hogy a TASK-1 csatorna farmakológiás aktiválását fel lehet-e használni terápiás céllal a pulmonális hipertónia bizonyos típusaiban [178,179].

#### 2.1.6.5 K<sub>2P</sub> csatornák a szívben

A szívben számos K<sup>+</sup> csatorna típus kifejeződik és ezek működése rendkívül összetett módon járul hozzá az ingerképzéshez, az ingerületvezetéshez és a pitvari és kamrai akciós potenciálok kialakításához [180]. A közismerten fontos élettani szerepet játszó legalább háromféle befelé rektifikáló, legalább ötféle feszültségfüggő és kalcium-aktivált K<sup>+</sup> csatorna típusokon kívül többféle K<sub>2P</sub> csatorna is megtalálható a szívben. A kardiális K<sub>2P</sub> csatornák funkcionális jelentőségét azonban mindeztáig viszonylag kevesen tanulmányozták [181,182]. Legnagyobb mennyiségben, mRNS szinten, a TWIK-1, TASK-1 és TALK-2 csatornák expresszálódnak a humán szív különböző régióiban [183]. A legnagyobb mRNS kifejeződést mutató TWIK-1 csatorna funkcionális szerepének megítélését nagyban nehezíti, hogy ez a csatorna alegység (vad típusú formájában) lényegében nem ad áramot heterolog rendszerben, és az is nagyon bizonytalan, hogy a TWIK-1 csatorna milyen K<sup>+</sup> áramot hozhat létre *in vivo* [184-189].

Legrészletesebben a TASK-1 csatorna szerepét vizsgálták a szívben. Az emberi szívben a TASK-1 mRNS mintegy 16-szor nagyobb mennyiségben expresszálódik a pitvari, mint a kamrai izomzatban [183]. Vagyis emberben a TASK-1 lényegében pitvar-specifikus expressziót mutat. Krónikus pitvarfibrillációban szenvedő betegekben a TASK-1 mRNS kifejeződés fokozódik [183,190] és ez hozzájárul a pitvari akciós potenciál időtartamának (action potential duration, APD) rövidüléséhez a betegekből izolált szívizomsejtekben. A TASK-1 (és TASK-3) csatornára szelektíven ható A293 gátlószer [191] a krónikus pitvarfibrillációban szenvedő betegekből izolált pitvari szívizomsejtekben normalizálta az APD-t, azonban nem változtatta a normál APD-t a szinuszritmussal rendelkező betegekből nyert kardiomiocitákban. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a TASK-1 csatorna részt vesz a krónikus pitvarfibrilláció patogenezisében és fokozott expressziója szerepet játszik a pitvari akciós potenciál rövidülésében [183].

Rágcsálókban a TASK-1 nem csak a pitvarokban, hanem a kamrákban is kifejeződik. Ennek megfelelően a TASK-1 gényiányos egérben a kamrai akciós potenciál időtartama megnyúlik és az EKG-n hosszú QT intervallum jelentkezik [192,193]. Ez azt sugallja, hogy a TASK-1 áram fiziológias körülmények között is jelentős mértékben hozzájárul a megfelelő akciós potenciál morfológiához, legalábbis egérben. A két független munkacsoport által megerősített gényiányos egér eredményekkel szemben, a TASK-1 csatorna szerepének megértését a pitvarfibrillációban bonyolítja az a megfigyelés, hogy amennyiben a pitvarfibrillációhoz szívelégtelenség is társul, akkor ez a TASK-1 kifejeződés csökkenésével jár sertés pitvarfibrillációs modellben [194]. Egy másik munkacsoport szintén a TASK-1 áram csökkenését írta le emberben krónikus pitvarfibrillációban és kutya pitvarfibrillációs modellben, illetve felvetette a TASK-1 foszforilációs gátlásának lehetőségét [195,196]. Ezekből az eredményekből nyilvánvaló, hogy további vizsgálatokra van szükség a TASK-1 szerepének pontosabb megértésére a pitvarfibrilláció vonatkozásában. Számos közlemény szól arról, hogy különböző antiarritmiás szerek (pl. amiodaron, propafenon vagy carvedilol) hatékonyan gátolják a TASK-1 csatornát [197-199]; azonban kérdés marad, hogy ezek az aránylag kis szelektivitású gyógyszerek hatásuk mekkora hányadát fejtik ki a TASK-1 csatorna gátlásán keresztül.

Csakúgy, mint a TASK és TREK alcsaládok széleskörben kifejeződő egyéb tagjainál minden esetben, a TASK-1 jövőbeni farmakológias befolyásolásával kapcsolatban is aggodalomra ad okot a célszervtől különböző lokalizációban kialakuló mellékhatások lehetősége. A pitvarfibrillációra adott TASK-1 inhibitor pulmonális hipertóniát okozhat, illetve fordítva, a pulmonális hipertónia kezelésére alkalmazott TASK-1 aktiváló gyógyszer szívritmus zavarhoz vezethet. Ezeket a lehetőségeket, a  $K_{2P}$  csatornákra ható szelektív hatóanyagok kifejlesztését követően, a jövőbeni kutatások tudják majd pontosan vizsgálni. Mindezekről függetlenül azonban a  $K_{2P}$  csatornákat reménykeltő farmakológiai célpontoknak tekinthetjük számos nagy orvosi jelentőségű kórfolyamatban, figyelembe véve azt, hogy több régóta bevált hatóanyag jelentős részben ezeken a csatornákon keresztül fejt ki a kívánt hatását.

## 2.2 Munkacsoportunk korábbi eredményei a $K_{2P}$ területen

Munkacsoportunk a PhD tanulmányaim indulásának időszakában kezdte meg a  $K^+$  csatornák vizsgálatát. A PhD és a kezdeti posztdoktori munkám éveiben öt elsőszerzős közleményem jelent meg a  $K_{2P}$  területen [200-204]. Ebben az időszakban munkacsoportunk más  $K^+$  csatornáról szóló közleményt nem publikált. A *Bevezetés* fejezet második részében (2.2) ezeket a kezdeti eredményeket mutatom be, amelyek az értekezés fő tárgyát képező munka előzményének tekinthetők. A bevezetésben szokásos módon nem csak saját eredményeket ismertetek, hanem ezek irodalmi háttérét és a  $K_{2P}$  terület fejlődésére kifejtett hatását is részletezem.

### 2.2.1 A TASK-1 és TASK-3 kifejeződik a glomerulóza sejtben

Munkacsoportunk közölte először, hogy a TASK-1 csatorna nagy mennyiségben expresszálódik a mellékvesekéreg zona glomerulóza sejtben és a  $K^+$  áramát az angiotenzin receptor ingerlése gátolja [200]. Az angiotenzin II hatására létrejövő TASK-1 gátlás hozzájárul a sejt depolarizációjához, a kalcium jel kialakulásához és a fokozott aldoszteron termeléshez [205]. Az általunk vizsgált patkány glomerulóza sejtben az erősen negatív nyugalmi membránpotenciált kialakító háttér  $K^+$  áram és a *Xenopus laevis* petesejt heterolog expressziós rendszerben kifejezett TASK-1 csatorna tulajdonságai azonban nem egyeztek meg tökéletesen. Hogy a két áramot azonos körülmények között hasonlítsuk össze, mRNS-t tisztítottunk a patkány mellékvese zona glomerulóza rétegéből (kapszuláris szövetből) és ezt mikroinjektáltuk *Xenopus* oocytákba. Az így nyert "glomerulóza áram" kevésbé volt pH érzékeny, mint a TASK-1. Emellett a ruténium vörös (rutenium red, RR) erőteljesen gátolta a "glomerulóza áramot", hasonlóan a glomerulóza sejt háttér  $K^+$  áramához [206], pedig ez a gátlószer a TASK-1 csatornára egyáltalán nem hatott az alkalmazott koncentrációban [202]. Ezek az anomáliák vezettek arra a gondolatra, hogy a patkány glomerulóza sejtben a háttér  $K^+$  áram gyakorlatilag minden tulajdonságában megegyezik a TASK-1 árammal (pl. TASK ellenes antiszenz oligonukleotid kivédte a "glomerulóza áram" expressziót [200]),

azonban mégsem lehet tiszta TASK-1 áram. Időközben felfedezték a TASK-3 csatornát [46,57], és azt találtuk, hogy eltérően a TASK-1 csatornától, a ruténium vörös kifejezetten gátolja a TASK-3 áramot [202]. A TASK-1 szekvenciára tervezett antiszenz oligonukleotid pedig a TASK-1 és TASK-3 között konzervált szekvencia részlet ellen készült, tehát a TASK-3 expressziót is kivédte. Northern blot kísérlettel kimutattuk, hogy a TASK-3 hatalmas mennyiségben kifejeződik a patkány glomerulóza sejtben és ez a háttér  $K^+$  áram legjelentősebb komponense [202].

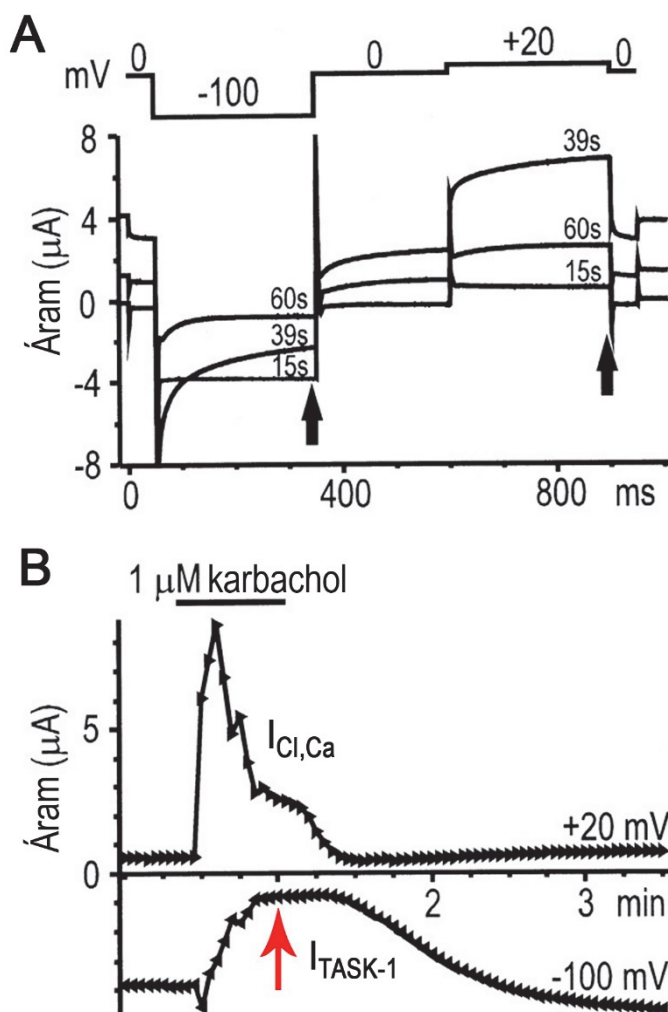
Munkánkkal párhuzamosan egy másik munkacsoport azt találta, hogy szarvasmarha glomerulóza sejtben a TREK-1 csatorna a döntő meghatározója a háttér  $K^+$  áramnak és a TASK-3 nem expresszálódik [207-209]. Ez arra utalt, hogy a háttér  $K^+$  áram tekintetében jelentős fajok közötti különbség van, tehát kérdéses, hogy a humán glomerulóza háttér  $K^+$  áram melyik állatkísérletes modellhez hasonló inkább. A humán glomerulóza sejt negatív nyugalmi potenciáljáért felelős  $K^+$  áram pontos összetétele mind a mai napig vizsgálat tárgyát képezi [210-212]. Az irodalomban általánosan elfogadott, hogy a TASK-1 nagymértékben kifejeződik, míg a TASK-3 gyakorlatilag nincs jelen az emberi glomerulóza sejtben. Emellett megtalálható a TREK-1 és a TASK-2, illetve a befelé rektifikáló  $K^+$  csatornák közé tartozó Kir3.4 (GIRK4, KCNJ5). Ez utóbbi csatornának külön orvosi jelentőséget kölcsönöz, hogy a szelektivitási filtert érintő bizonyos mutációk hatására elveszti a  $K^+$  szelektivitását és a rajta beáramló  $Na^+$  folyamatos depolarizációt eredményez; ez a patomechanizmus az aldosteron-termelő adenomák kb. 40 százalékáért felelős, vagyis a KCNJ5 mutációk a primer hiperaldoszteronizmus gyakori okai [213-216].

A TASK-3 és TASK-1/3 génhiányos egér modellekben alacsony renin szinttel járó hipertónia, illetve primer hiperaldoszteronizmus alakul ki [217,218], azonban a TASK csatornák inaktiváló mutációit emberben nem mutatták ki ezekben a kórképekben, az intenzív ilyen irányú vizsgálatok ellenére. Viszont a TASK-1 csatorna egyedi nukleotid polimorfizmusai (single nucleotide polymorphism, SNP) és a magas vérnyomás, illetve vérplazma aldosteron koncentráció között kapcsoltságot írtak le [219]. Tekintve, hogy a TASK-1 (globális vagy mellékvese-szövet-specifikus) génhiányos egérben enyhe

formában jelentkezik a hiperaldoszteronizmus, akár megtartott renin koncentráció melletti hipertónia formájában [218-220], felmerül a lehetőség, hogy a TASK-1 polimorfizmusok, illetve a csatorna szabályozásának multifaktoriális módosulása hozzájárulnak az esszenciális hipertónia egyes eseteinek kialakulásához.

### 2.2.2 A TASK-1 csatorna gátlása foszfolipáz C-n keresztül jön létre

A glomerulóza sejtben az angiotenzin receptor ingerlés a TASK-1 csatorna gátlását hozza létre. Ugyanezt a hatást reprodukáltuk a *Xenopus* petesejt expressziós rendszerben, ahol a TASK-1 csatornát koexpresszáltuk az AT<sub>1a</sub> angiotenzin receptorral [200]. A TASK-1 csatornával koexpresszált M<sub>1</sub> muszkarinos acetilkolin receptor (11. ábra), vagy a petesejt endogén lizofoszfatisav (LPA) receptorainak ingerlése is kiváltotta a háttér K<sup>+</sup> áram gátlását [201].



**11. ábra: A TASK-1 áramot gátolja az M<sub>1</sub> receptor ingerlése (piros nyíl).**

Reprezentatív áramok láthatók egy olyan oocytából, amelyben a TASK-1 csatornát és az M<sub>1</sub> muszkarinos acetilkolin receptort koexpresszáltuk. **A.** A felül látható feszültség lépés sorozatot ismételtük három másodpercenként 80 mM EC [K<sup>+</sup>] jelenlétében, 6 mV tartópotenciálról. Az áramokat ugyanabból a sejtől mutatjuk a karbachollal történő ingerlést megelőzően (15 s), a Ca<sup>2+</sup>-aktivált Cl<sup>-</sup> áram csúcsértékénél (39 s), illetve a TASK-1 áram gátlás maximumánál (60 s). **B.** Ugyanennek a sejtnek az áramait ábrázoltuk az idő függvényében a -100 és +20 mV-os feszültséglépések végén (az A panelen *fekete nyilak* jelzik). A TASK-1 áram -100 mV-on, a Ca<sup>2+</sup>-aktivált Cl<sup>-</sup> áram ( $I_{\text{Cl,Ca}}$ ) pedig +20 mV-on jelentkezik főként. Módosítva a [201] közleményből.

Ez idő tájt mások szintén megfigyelték a TASK-1 áramának kifejezett csökkenését (akár 80-90%-os gátlást) különböző  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptorok ingerlése során. A gerincvelői  $\alpha$ -motoneuronokban a pH-érzékeny háttér  $K^+$  áramot gátolta a szerotonin, a noradrenalin, a P anyag, a TRH (thyrotropin-releasing hormone) és bizonyos metabotrop glutamát receptor agonisták. Emellett a TASK-1 a HEK293 heterolog expressziós rendszerben is gátlódott a koexpresszált TRH-R1 receptor ingerlésekor [221]. A kisagyi szemcses sejtekben a tartós kifelé irányuló (standing outward,  $IK(SO)$ )  $K^+$  áramot, amely TASK áramnak felel meg, gátolta a  $G_q$ -fehérje kapcsolt  $M_3$  muszkarinos acetilkolin receptor ingerlése, de a  $G_i$ -fehérje kapcsolt  $M_2$  receptor ingerlés nem [222,223]. A későbbiekben általános megerősítést nyert, hogy a  $G_q$ -fehérje kapcsolt 7TM receptorok gátolják a TASK-1 csatornát [92].

Munkacsoportunk közölte elsőként, hogy a TASK-1 csatorna gátlása a foszfolipáz C enzim aktiválódásán keresztül jön létre [201]. A következtetésünket egyrészt arra alapoztuk, hogy a karbachol hatására létrejövő TASK-1 gátlás kivédhető volt az U-73122 foszfolipáz C gátlószerrel, a csatornát és az  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort koexpresszáló *Xenopus* petesejtekben (*nem mutatom*). Az eredményünk ellentmondott mások korábban közölt adatainak, melyek szerint az U-73122 nem befolyásolja a receptor-függő TASK-1 gátlást kisagyi szemcses sejtekben [222]. A farmakológiai eredményünket ugyanakkor megerősítettük molekuláris biológiai eszközökkel is. A  $G_i$ -fehérje kapcsolt  $M_2$  receptor ingerlése nem gátolta a TASK-1 áramot a mi kísérleti rendszerünkben sem. Ha azonban a TASK-1 csatornával és az  $M_2$  receptorral együtt foszfolipáz C  $\beta_2$  izoenzimet (PLC $\beta_2$ ) koexpresszáltunk, akkor ennek hatására az  $M_2$  receptor ingerlést követően létrejött a TASK-1 áram gátlása [201]. Azért választottuk ehhez a kísérlethez a PLC $\beta_2$  enzimet, mert erről ismert volt, hogy a  $G_i$  fehérje  $\beta\gamma$  alegysége aktiválja [224]. A PLC $\beta_2$  koexpresszióval, a  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptoroktól független módon, az egyébként hatástalan  $M_2$  receptor ingerlésével tudtunk foszfolipáz C-t aktiválni és ez a TASK-1 gátlást ebben az esetben is létrehozta. A több irányból megerősített eredményünket közöltük, miszerint a TASK-1 gátlása a foszfolipáz C aktiválódás következtében jön létre [201].

Problémát okozott viszont, hogy a foszfolipáz C által aktivált egyik klasszikus jelpálya sem hatott a TASK-1 csatornára [201]. A citoplazma inozitol-1,4,5-triszfoszfát ( $IP_3$ ) koncentrációjának növelése (*Xenopus* petesejt mikroinjektálással két-elektrodos feszültség clamp mérés közben) kiváltotta a kalcium jelet, illetve az ennek megfelelő kalcium-aktivált klorid áram megjelenését, azonban nem gátolta a TASK-1 csatornát. A protein kináz C (PKC) aktivációja PMA-val (phorbol 12-myristate 13-acetate) szintén nem befolyásolta a TASK-1 áramot, olyan körülmények között, amikor a PKC aktivációt egyértelműen igazoltuk. Ennek magyarázatára azt a hipotézist alakítottuk ki, hogy a TASK-1 csatorna gátlásért nem a foszfolipáz C termékei felelősek, hanem a szubsztrát fogyása, vagyis a plazmamembrán foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát ( $PIP_2$ ) deplációja. Ezt az elképzelést alátámasztotta az a kísérletünk, amelyben magas (20  $\mu M$ ) koncentrációjú wortmannin előkezelést követően, 3  $\mu M$  wortmannin folyamatos jelenlétében vizsgáltuk a TASK-1 áram visszatérési kinetikáját az  $M_1$  receptor-függő gátlásból. A wortmannin ebben a magas koncentrációban nemcsak a közismert célpontját, a foszfatidil-inozitol-3-kinázt (PI3K), hanem a foszfatidil-inozitol-4-kinázt (PI4K) is gátolja [225]. Ennek megfelelően akadályozza a  $PIP_2$  reszintézist a foszfolipid receptorfüggő bontását követően. A hipotézisünkkel jó összhangban a wortmanninnal kezelt petesejtekben a TASK-1 áram lassabban növekedett az  $M_1$  receptor ingerlés megszűntetését követően [201].

Az eredményünket, miszerint a TASK-1 gátlást a foszfolipáz C aktiváció hozza létre, a tudományos közvélemény kétkedéssel fogadta. Több éven keresztül újabb mechanizmusokat közöltek a TASK áram receptor-függő szabályozásának magyarázatára [222,226-228]. Alternatív hipotézisként felmerült, hogy a TASK-1 áramot a  $G_q$  fehérje  $\alpha$  alegység és a csatornafehérje közvetlen interakciója gátolja [226], illetve, hogy a TASK-1 gátlását mégis a protein kináz C valamelyik izoenzime hozza létre [227,228]. Később több független rendszerben kimutatták, hogy az U-73122 gátolja a foszfolipáz C-t és kivédi a receptor-függő TASK áram gátlást [229-231]. Ennek megfelelően ma általánosan elfogadott, hogy a foszfolipáz C aktiváció a TASK-1 gátlás oka.

Korábbi munkatársunk, Prof. Rohács Tibor munkacsoportja az Egyesült Államokban, velünk kollaborációban, leírta, hogy a TASK-1 csatorna árama kivágott, belsejét kifordított (inside-out) membránfoltban lecseng ("run down"), azonban a csatorna aktivitás visszaállítható  $\text{PIP}_2$  adásával, illetve az áram gátolható a polikation poli-lizin ("PIP<sub>2</sub> scavenger") alkalmazásával. A TASK-3 árama a membránfolt kivágása után kevésbé cseng le, azonban poli-lizinnel ez is gátolható, majd ezt követően  $\text{PIP}_2$ -vel újra aktiválható [96]. Ezek a vizsgálatok megerősítették a mások által korábban leírt megfigyeléseket a  $\text{PIP}_2$  TASK csatornákra kifejtett hatásáról kivágott membrán foltban [231]. Tehát többszörösen megerősített adat, hogy a TASK-1 és TASK-3 csatorna aktivitását befolyásolja a membrán  $\text{PIP}_2$  tartalma *in vitro*. Ennek ellenére, a TASK-1 csatornák receptor-függő gátlásáról kimutatták, hogy az a sejtmembrán  $\text{PIP}_2$  szintjétől függetlenül alakul ki *in vivo* [232]. A TASK-1 és TASK-3 receptor-mediált gátlásának oka, a jelenleg leginkább elfogadott mechanizmus szerint, a foszfolipáz C által termelt diacilglicerin (DAG) felhalmozódása a plazmamembránban (10. ábra) [230].

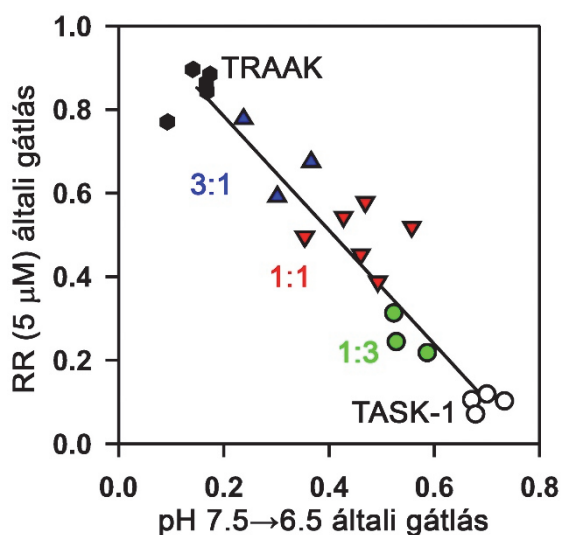
### 2.2.3 A TASK-1 és TASK-3 alegységek heterodimert képeznek

A  $\text{K}_{2\text{P}}$  csatorna alegységek dimerként működnek, vagyis adott a lehetősége, hogy különböző alegységek összeálljanak és ezáltal a homodimerektől eltérő tulajdonságú heterodimer csatornákat alkossanak. Elsőként munkacsoportunk közölte, hogy a TASK-1 és TASK-3 alegységek egymással heterodimert képeznek [203]. A kérdés vizsgálatára sajátos farmakológiai módszert terveztem és az ebből származó bizonyító erejű mérési eredményeim tették lehetővé a heterodimer első kimutatását.

A TASK-1 és TASK-3 homodimerek két biztos elkülönítő jegyéből indultam ki. Az egyik felhasznált lényeges különbség, hogy a pH 7.5-ről 6.5-re változtatása a TASK-1 homodimerek jóval nagyobb gátlását okozza, mint a TASK-3 homodimerekét. A másik farmakológiai szelektivitást biztosító eszköz a homodimerek ruténium vörös (ruténium red, RR) iránti eltérő érzékenysége volt. A TASK-3 homodimert a RR erősen gátolja, míg a TASK-1 homodimerre lényegében nem hat. Mindkét tulajdonság (a pH és RR érzékenység) alkalmas

a kétféle homodimer elkülönítésére (heterolog rendszerben), de magában egyik sem használható a heterodimerizáció vizsgálatára. Ha viszont a mért áram fenti két tulajdonságát egyaránt meghatározzuk (és egy grafikonon egymás függvényében ábrázoljuk), akkor ebből kinyerhető a heterodimer létezésére vonatkozó információ.

A módszer működésének szemléltetésére először tételezzük fel, hogy a két különböző alegység nem képez heterodimert, azonban a homodimereik áramára jellemző pontok a pH vs. RR gátlás grafikonon jól elkülönülnek. (Az utóbbi feltételt teljesítik pl. a TASK-1 és TRAAK alegységek, ld. a 12. ábrát.)



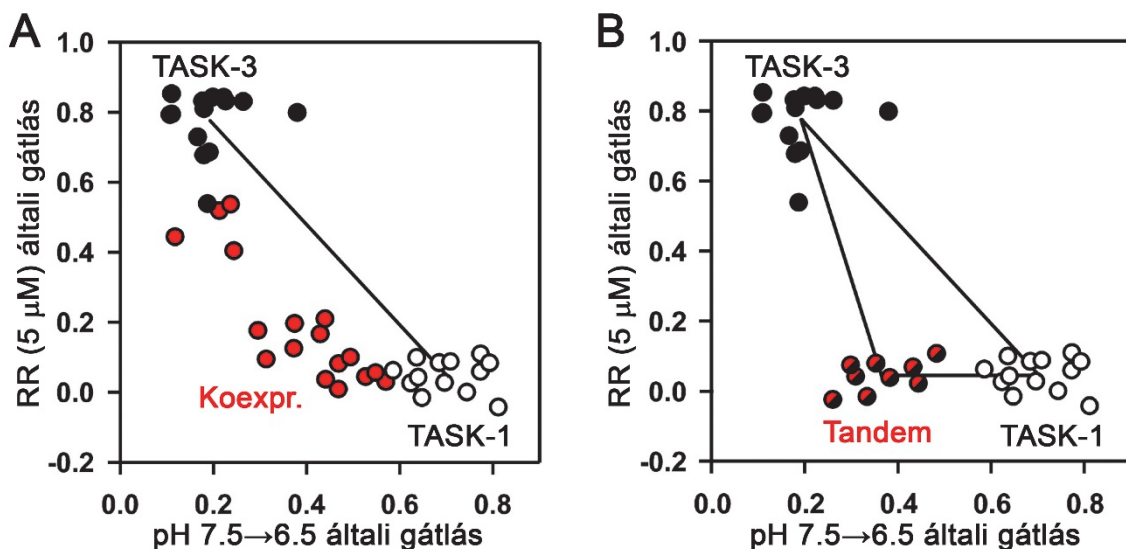
**12. ábra: A TASK-1 és TRAAK alegység koexpresszióval kifejezett áram gátlása pH változás és RR hatására.** A TASK-1 homodimerek áramát a pH↓ erősen, a RR alig gátolja (*fehér körök*). A TRAAK homodimerek áramát viszont a RR gátolja erősen, de a pH↓ alig (*fekete hatszögek*). Ha az alegységek cRNS-ét különböző arányokban koinjektáljuk (TRAAK:TASK-1 arány 3:1 *kék háromszög*; 1:1 *piros háromszög*; 1:3 *zöld kör*), akkor az áramokra jellemző pontok a magukban kifejezett alegységek adatainak átlagát összekötő szakasz mentén helyezkednek el. (Minden szimbólum egy sejtnek felel meg.) Módosítva a [203] közleményből.

Ha a két különböző alegység nem képez heterodimert, akkor a koexpressziójuk egymás mellett megjelenő homodimereket eredményez. Ha viszont csak a két homodimer van jelen különböző arányokban, akkor az ezeknek megfelelő keverék áramok pontjai, a pH vs. RR gátlás grafikonon, a két magában kifejezett homodimer áramának pontjait összekötő egyenesen találhatók. Ez utóbbi megállapítás a módszer lényege. Az állítás elemi matematikai eszközökkel, az "osztópont tétellel" analóg módon, könnyen bebizonyítható (ld. az értekezés végén a *Függelék* fejezetben).

Ha tehát nem képződik heterodimer, akkor a két alegység koexpressziójával kapott pontok a pH-gátlás/RR-gátlás koordináta rendszerben a homodimerek pontjait összekötő egyenesre esnek. Az állítás megfordítása

azonban nem feltétlenül igaz. Ha az alegységeket koexpresszáló sejtekből kapott pontok a homodimerek pontjait összekötő szakaszra esnek, akkor nem biztos, hogy nem képződött heterodimer. Előfordulhat ugyanis, hogy a heterodimer pH és RR iránti érzékenysége úgy viszonyul egymáshoz, hogy a heterodimer pontjai is a homodimereket összekötő szakaszra esnek. Emiatt például a 12. ábrán bemutatott adatokból nem lehet közvetlenül arra következtetni, hogy a TASK-1 és TRAAK alegységek nem képeznek heterodimert. A módszer fő erőssége tehát, hogy amennyiben a koexpresszióból kapott pontok *nem* esnek a homodimereket összekötő szakaszra, akkor az bizonyítja, hogy nem csak a homodimerek adták az áramot. Vagyis a módszerrel a heterodimer létezése (szerencsés esetben) bizonyítható, de a megközelítés nem alkalmas a heterodimerizáció kizárására.

Ha a TASK-1 és TASK-3 alegységeket koexpresszáltuk különböző arányokban, akkor az áramoknak megfelelő pontok nem estek a homodimereket összekötő szakaszra (13.A ábra).



### 13. ábra: A TASK-1 és TASK-3 alegységek heterodimert képeznek

**A.** A csak TASK-1-et (fehér körök), vagy csak TASK-3-at (fekete körök) kifejező, illetve a mindkét alegységet különböző arányokban koexpresszáló (piros körök) *Xenopus* petesejtekben a háttér  $K^+$  áram pH érzékenységét és ruténium vörös (RR) általi gátlását mértem. A szakasz a tiszta TASK-1 és TASK-3 homodimer adatpontok átlagait köti össze. A koexpresszáló sejtekből származó összes adatpont a szakasz alatt helyezkedik el. **B.** Molekuláris biológiai módszerekkel a TASK-3 és TASK-1 alegységet egy polipeptid láncra fűztük össze és meghatároztuk ennek a "tandem" csatornának is a pH és RR általi gátlását (piros ● szimbólumok). A tandem csatornát a pH↓ közepesen, a RR pedig gyakorlatilag nem gátolja. A háromszög oldalai a három csatorna típus adatpontjainak átlagait köti össze. Módosítva az [203] közleményből.

A TASK-1 és TASK-3 alegységeket koexpresszáló sejtekben a közepes pH érzékenységhez arányában túlzottan alacsony RR általi gátlás társult, amely nem magyarázható a TASK-1 és TASK-3 homodimerek egymás melletti kifejeződésével. Ha a TASK-3 és TASK-1 alegységeket egy polipeptid láncná építettük össze, megfelelő leolvasási keretben a TASK-3 stop és TASK-1 start kodonok elhagyásával, akkor az így kapott "tandem" konstrukció is jól működött a petesejt heterolog rendszerben és hasonló eredményt adott, mint a koexpresszált alegységek (13.B ábra). Várható volt, hogy a két különböző alegység egy fehérjeláncná összeépítése kedvez a heterodimerizációnak. A tandem konstrukció mérése lehetővé tette a TASK-1/TASK-3 heterodimer tulajdonságainak vizsgálatát a homodimerek zavaró hatása nélkül. A tandem csatorna adatpontjai is a homodimereket összekötő szakasz alá esnek, és jól mutatják a heterodimer közepes pH érzékenységét és a váratlanul csekély gátlását ruténium vörös hatására (13.B ábra).

Ezek az eredmények megnyugtató módon igazolták, hogy a TASK-1 és TASK-3 alegységek heterodimert képeznek [203]. A TASK-1/TASK-3 heterodimer létezését mások is hamar megerősítették és a csatorna fiziológiás szerepét vizsgálni kezdték [233]. Azonban több mint tíz évnek kellett eltelnie ahhoz, hogy a következő  $K_{2P}$  csatorna alegység heterodimerizációt közöljék: a THIK-1 és az önmagában funkcionálisan nem expresszáldó THIK-2 alegységek heteromerizációját mutatták ki [234].

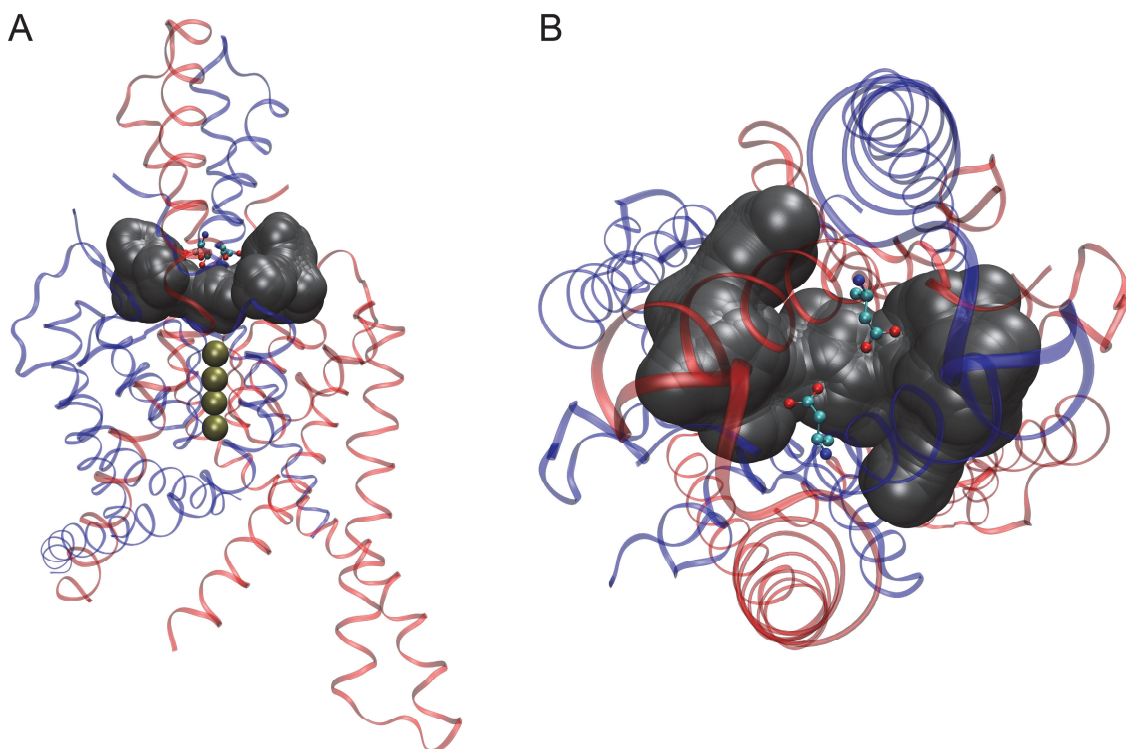
A TASK-1/TASK-3 heterodimer korai felfedezését az tette lehetővé, hogy a heterodimer aszimmetrikusan "örökl" a RR iránti érzékenységet a homodimerektől. A heterodimer tartalmaz ugyan egy TASK-3 alegységet, ennek ellenére mégsem gátolja a RR (5  $\mu$ M), ebből a szempontból teljesen hasonlóan viselkedik, mint a TASK-1 homodimert. Ennek az okát akkor sikerült megérteni, amikor a TASK-3 RR általi gátlásának mechanizmusát vizsgáltuk [204]. A TASK-3 csatornában azonosítottam a negatív töltésű glutamát 70 (E70) aminosavat, amelynek a mutációja (E70R vagy E70C) megakadályozza a RR gátló hatását (ld. a 10. ábrát). Ha a két TASK-3 alegységből összefűzött tandem konstrukciónak csak az egyik felében mutáltuk az "E70" aminosavat, akkor is megszűnt a RR gátló hatása. Ebből arra következtettünk, hogy a RR egyszerre

mindkét E70 aminosavhoz kötődik a TASK-3 homodimerben és már az egyik aminosav cseréje is elrontja a RR-kötőhelyet. A TASK-1 alegységben a 70-es pozícióban pozitív töltésű lizin található (K70, amelynek a K70E mutációja RR-érzékennyé teszi a mutáns TASK-1 áramát). Így tehát a TASK-1/TASK-3 heterodimerben csak egy E70 található (a TASK-3 alegységben), ez pedig egymagában nem teszi lehetővé a RR kötését [204].

A közelmúltban Braun Gabriella PhD hallgatóm kimutatta, hogy a fentiekhez nagyon hasonlóan a TREK alcsalád két tagjának RR érzékenysége is egyetlen aminosavtól függ [235]. A TREK-2 csatornát gátolja a RR, mert negatív töltésű aszpartátot (D135) tartalmaz, a TASK-3 E70 aminosavához hasonló pozícióban (14. ábra). Ezzel szemben a TREK-1 csatornára a RR nem hat, mivel a megfelelő helyen hidrofób izoleucin található. Ezután kézenfekvő volt, hogy a TREK csatornák eltérő RR érzékenységét felhasználva hasonlóan vizsgáljuk a heteromerizáció kérdését a TREK alcsaládban, mint korábban a TASK csatornák között [236]. A TREK-1 és TREK-2 heterodimert alkot és a heterodimer képzésben a TREK alcsaládon belül a TRAAK alegység is részt vehet, tehát TREK-1/TRAAK és TREK-2/TRAAK heterodimerek is kialakulhatnak [237,238].

Mára többirányú megerősítést nyert a TASK-1/TASK-3 heterodimerek előfordulása több élettani szempontból kiemelt jelentőségű sejttypusban. A ruténium vörös gátlószert munkánk nyomán kiterjedten használták a TASK áramok vizsgálatára kisagyi szemcsesejtben [233,239,240], motoneuronban [241,242], thalamokortikális relé neuronban [243], glomus caroticum kemoreceptor sejtben [149], szívizomsejtben [244], pulmonális artéria simaizomsejtben [167] és számos más sejttypusban [245-253]. Néhány esetben kísérlet történt annak kvantitatív meghatározására, hogy a TASK-1/TASK-3 heterodimer csatorna mekkora hányadban felelős az adott sejttypus teljes háttér  $K^+$  konduktanciájáért. A kisagyi szemcsesejtek tartós kifelé irányuló (standing outward,  $IK(SO)$ )  $K^+$  áramának mintegy 44%-át adják a TASK-1/TASK-3 heterodimer csatornák [233]. A motoneuronok háttér  $K^+$  áramánál 52%-os értéket közöltek [241], vagy az áram fő komponensének találták a TASK-1/TASK-3 heterodimert [242]. A patkány glomus caroticum kemoreceptor

sejtben írták le eddig a TASK-1/TASK-3 heterodimer legnagyobb, 75 %-os mértékű hozzájárulását a teljes háttér  $K^+$  áramhoz [149]. Ezek a magas százalékos értékek azt sugallják, hogy a heterodimer képződés preferált lehet a homodimerekével szemben egyes sejttypusokban, ahogy ennek a lehetőségét az első közleményünkben mi is felvetettük [203].



**14. ábra: A D135 aminosavak a TREK-2 extracelluláris ionút (extracellular ion pathway, EIP) "mennyezetén" képeznek lokális negatív töltést**

**A.** A TREK-2 kristályszerkezet "oldalnézeti" képe (PDB: 4BW5, [37]). Az EIP a plazmamembrán síkjával párhuzamosan biztosít két oldalról bejáratot az EC térből a pórushoz a sapka (CAP) domén alatt, T alakú elrendezésben, ahol a T vízszintes teteje az EIP, a függőleges szára pedig a csatorna pórus. Az EIP üregének geometriáját a szürke alakzat ábrázolja, ehhez tartozik minden térrész, ahova egy 2.5 Å sugarú gömb el tud jutni, de egy 7 Å sugarú nem fér hozzá az EC térből. A  $K^+$  kötőhelyeket a szelektivitási filterben bronz színű gömbök jelölik. **B.** Az A panelen bemutatott szerkezet nagyított "felülnézeti" képe, a pórus tengelye irányából, az EC oldal felől. A nézőpont kevéssel a sapka domén csúcsa felett van, a ránézési sugármenetek csaknem egybeesnek a C1 sapka hélixek tengelyével (ld. a panel tetején és alján). A két alegység D135 aminosav maradékait pálcika reprezentációban mutatom (mindkét panelen), ahol a szénatomok türkiz, a nitrogén atomok kék, az oxigének pedig piros színnel ábrázolódnak. (A peptidkötés karbonil oxigénje nem szerepel az ábrázolásban.) Az aszpartátok karboxilcsoportjának negatív oxigénjei a pórus EC bejárata fölött alkotják az EIP alagút tetejét. A TREK-2 alegységeket áttetsző szalag reprezentálja, piros és kék színekkel mindkét panelen. Az ábra a Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.1) szoftverrel készült [254], az EIP térkitöltő ábrázolását a saját fejlesztésű "Protein internal Channel & Cavity estimation" (PrinCCes) programmal állítottam elő [255].

Habár a heterodimerizáció ténye egyértelművé vált az elmúlt évek folyamán, jelenleg még kevés ismerettel rendelkezünk arról, hogy a TASK-1/TASK-3 csatorna melyik speciális tulajdonsága indokolja a nagy expresszióját az élettani szempontból kiemelt jelentőségű sejttypusokban. Felmerül a lehetősége, hogy a heterodimerizáció kombinálja a TASK-3-ra jellemző nagyobb elemi áramot [149,233] a TASK-1 nagyobb érzékenységeivel a  $G_q$ -kapcsolt receptor ingerlésre [203]. A glomus sejtben emellett jelentős lehet, hogy a heterodimerizáció érzékenységet kölcsönöz a pH változásokra a homodimerek pK értékei közé eső tartományban [203].

### 2.3 Az értekezésben bemutatott kísérletek motivációja

A 2.2 fejezetben ismertetett korábbi kísérleteink kapcsán számos alapvető módszert beállítottunk laboratóriumunkban, beleértve a *Xenopus laevis* petesejtek két elektródos feszültségzár mérését, vagy a teljes sejt patch clamp technikát a  $K^+$  áramok tanulmányozására. A módszertani fejlesztéseken kívül megszereztük a  $K_{2P}$  csatornák vizsgálatához szükséges jártasságot a glomerulózsa háttér  $K^+$  áram és a TASK-1 mérése során, mely utóbbihoz az első expressziós plazmidot Prof. Michel Lazdunski laboratóriumából Prof. Florian Lesage küldte el nekünk önzetlenül, aki az első emlős  $K_{2P}$  csatornák klónozása miatt vált ismertté. Köszönetünk jeleként kértük, hogy legyen társszerző az első közleményünkben [200]; ezt később több személyes találkozás és franciaországi tanulmányút követte.

A 2000-es évek elején általános lelkesedés és izgalom lett úrrá az orvosbiológiai kutatási területen a humán genom szekvenálásából nyert adatok elérhetősége miatt. Ez a motiváló érzés valamilyen mértékben hozzám is elért, így én is letöltöttem a már hozzáférhető nyers szekvencia adatokat és erőpróbaként számítógép programot kezdtem fejleszteni, hogy új  $K^+$  csatorna géneket azonosítson a humán genomban. A programot az Élettani Intézetben több munkatárs számítógépén éjszakákon keresztül futtatva lépésről lépésre dolgoztam fel az egyes kromoszómák szekvencia tartományát. Eredményül két addig nem ismert  $K^+$  csatorna gént kaptam. Nagy öröömre az egyik gén exon-intron szerkezete könnyen jósolhatónak bizonyult és az exonokból összeállított

kódoló szekvencia négy transzmembrán régiót és két pórusdomént tartalmazott. Nyilvánvalóvá vált, hogy egy  $K_{2P}$  csatornát találtam.

Az első TRESK áramot 2002. június 21-én mértem és még aznap észrevettem, hogy a petesejt endogén lizofoszfátidsav (LPA) receptorainak ingerlése többszörösére növeli az áramot. Ekkor vált egészen egyértelművé, hogy új fejezetet nyitottam munkacsoportunk  $K_{2P}$  vizsgálataiban.

Az azóta eltelt időszakban a tudományos érdeklődésem középpontjában a TRESK csatorna szabályozási mechanizmusainak vizsgálata állt. A megközelítésem jellegéből adódóan kezdetben semmit nem tudtam a csatorna élettani jelentőségéről, azonban az elbűvölő szépségű kalcium-függő szabályozási mechanizmus annak ígéretét hordozta, hogy hamarosan fény derül a TRESK csatorna emberi szervezetben betöltött fontos szerepére.

Ez azonban nem egészen így alakult. Ki tudtuk ugyan mutatni a TRESK mRNS-t néhány szövetben, pl. egér kisagyban vagy herében, azonban a többi  $K_{2P}$  csatornánál megszokott expressziós szintekhez képest elenyészően kis mennyiségben. Így tehát az első évek annak a gondolatnak az árnyékában teltek, hogy a "TRESK csatorna sehol nem expresszálódik". Végül 2006-ban Kang és mtsai. kimutatták, hogy a TRESK nagy mennyiségben megtalálható a hátsó gyöki ganglion szenzoros neuronokban [14].

Rá egy évre Dobler T. és mtsai. elkészítették az első TRESK génhiányos egeret. Ezzel megkezdődött a második negatív korszak, ugyanis nem találtak jelentős fenotípus változást [256]. Chae és mtsai. alapos vizsgálatokat követően ugyanezt az eredményt megerősítették [257]. Időközben Lafrenière és mtsai. közölték a *Nature Medicine* folyóiratban, hogy a TRESK egy bizonyos kereteltolódásos mutációja migrént okoz [17]. Azonban ezt mások nem tudták alátámasztani, viszont kimutatták az aránylag gyakori C110R funkcióvesztő TRESK mutációról, hogy az (heterozigóta formában) nem okoz migrént [258]. A korszakra jellemző módon túlértékelt génhiányos egér negatív eredmények miatt éveken keresztül, részben kimondatlanul, lappangott a kétely, hogy a "TRESK csatorna kifejeződésének nincs funkcionális jelentősége".

Csak az elmúlt évben következett be áttörés, tizenöt évvel a TRESK klónozását követően. Három munkacsoport egymástól függetlenül egyértelmű

fenotípust rendelt a TRESK csatorna hiányához egér modellben [15,16,259], és bebizonyosodott, hogy a TRESK egyes domináns-negatív kereteltolódásos mutációi tényleg migrént okoznak [18,260]. Óhatatlanul mosolyt csálnak az alapkutató arcára ezek az eredmények, hiszen az elmúlt tizenöt év folyamán felderített sejt és fehérje szintű TRESK szabályozási mechanizmusok tudásanyaga a nagy orvosi jelentőségű fájdalomérzés és a kiemelt gyakorlati fontosságú migrén kutatási területeken használható fel.

### 3. 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.

## 4. MÓDSZEREK

### 4.1 Molekuláris biológia

A humán TRESK exonokat genomiális DNS-ből sokszorozítottuk és polimeráz láncreakció (PCR) segítségével építettük össze. Az egér TRESK cDNS-t kisagy RNS-ből amplifikáltuk reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével. A cDNS végeket RACE (Rapid amplification of cDNA ends) módszerrel klónoztuk. Számos további (pl. 14-3-3 vagy kináz) konstrukciónál hasonlóan jártunk el; a különböző egér szövetekből TRIzol reagenssel (Invitrogen) tisztított RNS-ből RT-PCR módszerrel sokszorozítottuk a cDNS-t. A kész konstrukciókat pEXO vagy pXEN (GenBank: EU267939.1) *Xenopus* expressziós plazmidba ligáltuk és szekvenálással ellenőriztük.

A konstrukciók mutáns változatait leggyakrabban a QuikChange irányított mutagenézis módszerrel (Stratagene) készítettük el a gyártó leírásának megfelelően. A mutációk előállításához használt primerpárok szekvenciáját a saját fejlesztésű SeqHandler szoftverrel terveztem [4], úgy, hogy a primerek csendes (silent) mutációt is tartalmaztak, amely nem változtatta az aminosav szekvenciát, de új restrikciós hasítási helyet hozott létre. A mutációk kisebb hányadát és az egyéb (pl. csonkolt vagy láncolt) konstrukciókat a PCR módszer megfelelő alkalmazásával készítettük.

A cRNS-eket *in vitro* szintetizáltuk az mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription kittel (Ambion). A pXEN templát plazmidot restrikciós enzimmel linearizáltuk úgy, hogy a cRNS a kódoló régió körül a plazmidba épített *Xenopus* globin mRNS 5' és 3' nem transzlált régiókat (UTR) is tartalmazta, amelyek növelték a cRNS stabilitását az oocyta citoplazmájában. A cRNS megfelelő minőségét elektroforézissel igazoltuk formaldehid tartalmú denaturáló agaróz gélen, etídium-bromid festés segítségével.

A patch clamp méréseknél használt, COS-7 vagy HEK-293 sejtek transzfekciójához szükséges, plazmid konstrukciókat úgy kaptuk, hogy a kódoló régiót pcDNA3, pCI, vagy pIRES-CD8 vektorokba szubklónoztuk. A pIRES-CD8

vektor (internal ribosome entry site) lehetővé tette a transzfektált sejtek azonosítását anti-CD8 antitesttel bevont mikrogöngyök (Dynabeads) segítségével, mert erről a plazmidról a kívánt fehérje konstrukción kívül a CD8 sejtfelszíni marker is kifejeződik.

A bakteriális fehérje expresszióhoz használt konstrukciókat leggyakrabban úgy állítottuk elő, hogy a kódoló régiót a pGEX (Amersham) vagy pET (Novagen) plazmid rendszerek valamelyik változatába szubklónoztuk. Az ezekről képződő glutation-S-transzferáz (GST) vagy hexahisztidin (H<sub>6</sub>) fúziós fehérjéket az *E. coli* BL21 törzs valamelyik (pl. Rosetta vagy Star) változatában isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) indukcióval kifejeztük, majd a baktériumok ultrahangos feltárását követően glutation- vagy Ni-NTA-agaróz gélen affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

#### 4.2 A *Xenopus* petesejtek preparálása és mikroinjektálása

Afriai karmosbékából (*Xenopus laevis*) eltávolított ovárium lebenyeket kollagenázzal (1-2 mg/ml) emésztettünk OR2 oldatban 18 °C-on. Az OR2 összetétele mM-ban a következő volt: NaCl 82.5, KCl 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 5 (pH 7.5, NaOH). A megfelelő méretű és érettségű petesejtekről a follikuláris réteget finom csipeszekkel lefejtettük, majd a sejteket felhasználásukig módosított Barth's oldatban tároltuk 18 °C-on. A módosított Barth's oldat összetétele mM-ban a következő volt: NaCl 88, KCl 1, NaHCO<sub>3</sub> 2.4, MgSO<sub>4</sub> 0.82, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33, CaCl<sub>2</sub> 0.41, HEPES 20 (pH 7.5, NaOH), Na-piruvát 4.5, teofillin 0.5, kiegészítve penicillinnel (100 U/ml) és streptomycinnel (100 µg/ml).

Az oocyták mikroinjektálása a defollikulálás után egy nappal történt. Sejtenként 50 nl cRNS oldatot injektáltunk (Nanoliter Injector, World Precision Instruments). A kísérleti tervnek megfelelően az oldat sok esetben különböző cRNS-ek keverékét tartalmazta. Jellemzően 0.3-1.2 ng cRNS-t injektáltunk oocytánként a megfelelő expressziós szintek elérésére, egyes különleges esetekben 0.1 ng/sejt is elégséges volt a kifejeződéshez, vagy jóval nagyobb pl. 25 ng/sejt mennyiségre volt szükség. A *Xenopus* oocytákból kivágott, belsejét kifordított (inside-out), membrán folt méréseket megelőzően, 200 mM kálium-

aszpartát tartalmú oldatban zsugorítottuk a sejteket és finom csipeszekkel eltávolítottuk a patch clamp mérést akadályozó vitellin membránt a sejtfelszínről. Az elektrofiziológiai méréseket a mikroinjektálást követő harmadik napon végeztük.

#### 4.3 Két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) mérés

A *Xenopus* petesejtekben a  $K^+$  áramokat két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) módszerrel mértük OC-725C erősítővel (Warner Instrument Corp.). Az adatokat Digidata 1200 vagy 1440A (Axon Instruments) AD/DA konverterrel digitalizáltuk és a pClamp 6.0.2 vagy 10.1 szoftver (Molecular Devices) Clampex programjával rögzítettük, majd a Clampfit programmal értékeltük. Az intracelluláris mikroelektrodokat boroszilikát üvegből készítettük P-87 pipettahúzó berendezésben (Sutter Instrument). A mikroelektrodok 3 M KCl oldattal feltöltve 0.3-1 M $\Omega$  ellenállásúak voltak. A oldattal töltött mikropipettákat Ag/AgCl elektródon keresztül kötöttük az erősítő berendezéshez.

A TRESK áramot leggyakrabban a magas (80 mM), illetve alacsony (2 mM)  $K^+$  koncentrációjú oldatban mért áramok különbségeként határoztuk meg. A háttér  $K^+$  áramokat jellemzően 300 ms hosszú feszültséglépések végén (az esetleg jelenlévő feszültségfüggő áramok deaktivációját követően) -100 mV-on mértük, és a feszültséglépést három vagy négy másodpercenként ismételtük. Az alacsony  $K^+$  koncentrációjú oldat összetétele mM-ban a következő volt: NaCl 95.4, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 5 (pH 7.5, NaOH). A magas  $K^+$  koncentrációjú oldatban a  $[Na^+]$ -t úgy csökkentettük, hogy a teljes kation koncentráció állandó maradt. A petesejt körül a mérőoldatot folyamatosan áramoltattuk, hidrosztatikai nyomáskülönbség elvén működő perfúziós rendszerrel. Az áramokat szobahőmérsékleten (21 °C) mértük.

A fenti mérési feltételek mellett a desztillált vízzel mikroinjektált kontroll oocyták endogén  $K^+$  árama többnyire nem haladta meg az 50-200 nA nagyságot a petesejt preparátumokban. A legtöbb mérésünkben az endogén  $K^+$  áram nagysága elhanyagolható volt a legalább tízszer nagyobb expresszált TRESK áramhoz képest.

#### 4.4 Patch-clamp mérés

A teljes sejt (whole cell) felállásban a COS-7 vagy HEK-293 sejtek áramait RK-400 (Biologic) vagy Axopatch-1D (Axon Instruments) erősítővel mértük. A mikroelektrodokat vékonyfalú boroszilikát üvegből P-87 pipettahúzó berendezéssel (Sutter Instrument) készítettük, majd utóhőkezeltük (fire polish), így a pipetta oldattal feltöltésüket követően az ellenállásuk 3 és 9 M $\Omega$  között alakult. A COS-7 sejtek mérésénél a pipettaoldat összetétele a következő volt mM-ban: KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 5, HEPES 10 (pH 7.3, NaOH). A kalciumfüggő TRESK szabályozást lehetővé tevő HEK-293 sejt mérésekben alacsonyabb EGTA koncentrációt alkalmaztunk, az összetétel mM-ban a következő volt: KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 3, EGTA 0.05, Na<sub>2</sub>ATP 1, Na<sub>2</sub>GTP 0.1, HEPES 10 (pH 7.3, NaOH). A mérések egy részében az ATP-t és GTP-t kihagytuk a pipettaoldatból. A COS-7 sejtek mérésénél a magas K<sup>+</sup> koncentrációjú extracelluláris oldat a következőket tartalmazta mM-ban: KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 4, and HEPES 10 (pH 7.4, NaOH). Az alacsony, 4 mM K<sup>+</sup> koncentrációjú EC oldatban a KCl-t NaCl-dal helyettesítettük megfelelően. A HEK-293 méréseknél az alacsony Ca<sup>2+</sup> és K<sup>+</sup> koncentrációjú EC oldat összetétele a következő volt mM-ban: NaCl 140, KCl 2, MgCl<sub>2</sub> 2.5, glukóz 11, EGTA 0.05, HEPES 10 (pH 7.4, NaOH). A magas, 30 mM K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatban az előzőhöz képest 28 mM-lal csökkentettük a Na<sup>+</sup> koncentrációt. Az ionomycinnel történő ingerlés közben (és esetenként után) az előző két oldat olyan változatát használtuk, amelyek EGTA helyett kétértékű ionokat (2 mM Ca<sup>2+</sup> és 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>) tartalmaztak.

A *Xenopus* petesejtekből készített belsejét kifordított (inside-out) és külsejét kifordított (outside-out) membrán folt méréseknél az Axopatch-1D (Axon Instruments) erősítőt használtuk. A mikroelektrodokat vastag falú boroszilikát üvegből készítettük, ezek ellenállása hőutókezelés (fire polish) és pipettaoldattal feltöltés után 30-80 M $\Omega$  volt. Az outside-out méréseknél a pipettaoldat és az EC oldatok összetétele ugyanaz volt, mint a COS-7 teljes sejt méréseknél. Az inside-out méréseknél a pipettaoldat a következőket tartalmazta mM-ban: KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 4, HEPES 10 (pH 7.4, NaOH). Az EC oldatok összetétele pedig: MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 5, HEPES 10 (pH 7.3, NaOH) plusz KCl 140

volt a magas  $K^+$  koncentrációjú oldatban, vagy plusz KCl 4 és NaCl 136 az alacsony  $[K^+]$  esetén. Az egyedi csatorna (single channel) méréseknél a mérőpipetták külsejét bevontam R-6101 elasztomerrel (Dow Corning) a kapacitás csökkentése céljából. A teljes sejt méréseknél legalább  $10\text{ G}\Omega$ , a kivágott folt méréseknél  $20\text{--}40\text{ G}\Omega$  seal ellenállást fogadtunk el. Az egyedi csatorna méréseknél a nyolcpólusú Bessel filter aluláteresztő határfrekvenciája  $2\text{ kHz}$ , a mintavételezés frekvenciája pedig  $10\text{ kHz}$  volt. A jelet Digidata 1200 segítségével digitalizáltuk és pClamp 6.0.2 szoftverrel regisztráltuk.

#### 4.5 Rekombináns fehérjék tisztítása

A GST fúziós fehérjéket kifejező *E.coli* BL21 baktériumokat szonikálással feltártuk jéghideg G-lízis (vagy hasonló) oldatban. A G-lízis oldat összetétele mM-ban a következő volt: Tris-HCl 50 (pH 7.6), KCl 50, NaCl 50, EDTA 1, dithiothreitol 1, PMSF 1, benzamidin 0.1. A lizátumot centrifugáltuk (10-15 ezer g-vel 10-20 percig,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on), majd a fúziós fehérjét glutation-agaróz (SIGMA) affinitás kromatográfiával tisztítottuk a felülúszóból. A GST pulldown kísérletekben a rezinen immobilizált fehérjét használtuk, néhány más kísérletben a fúziós fehérjét eluáltuk a rezinről 20 mM glutationnal kiegészített G-lízis oldattal, majd az eluátumot egy éjszakán keresztül dializáltuk  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on a fehérjének megfelelő tároló oldattal. A hosszú távon  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tárolt aktív MARK kináz enzim konstrukciók tároló oldata 50% glicerint is tartalmazott.

A thioredoxin-His<sub>6</sub> (Trx-His<sub>6</sub>) fúziós fehérjéket szintén natív körülmények között tisztítottuk. A fehérjéket kifejező baktériumokat jéghideg N-lízis oldatban szonikáltuk, ahol az N-lízis oldat összetétele mM-ban a következő volt: foszfát 30 (pH 7.8, NaOH), NaCl 200, MgCl<sub>2</sub> 2, PMSF 1, benzamidin 0.2, imidazol 5,  $\beta$ -merkaptoetanol 5.6. A fehérjéket Ni-NTA agaróz (Qiagen) affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Ez a tisztítási eljárás jóval érzékenyebb volt a mosási lépések számára és a mosóoldat összetételére, mint a glutation-rezines kromatográfia. Egy ml rezint hatszor mostunk egyenként 5 percig 12 ml N-lízis oldattal, a második és harmadik pár mosásnál az imidazol koncentrációt 20, illetve 50 mM-ra növeltük a nem specifikusan kötődő bakteriális fehérjék

eltávolítására. A fúziós fehérjét 256 mM imidazol tartalmú oldattal eluláltuk, majd tárolóoldatba dializáltuk (Tris-HCl 20 (pH 7.3), NaCl 100, KCl 50, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 1, and dithiothreitol 0.1).

A C-terminálisukon oktahisztidin címkével ellátott TRESK hurok konstrukciók ("vad típusú" és számos mutáns TRESKloop-His<sub>8</sub>) inklúziós testekben halmozódnak fel a bakteriális expresszió során. Ezért ezeket denaturáló körülmények között tisztítottuk. Az inklúziós testeket a szonikálást követően többszöri mosás és centrifugálás után a pelletben kaptuk meg a többi bakteriális alkotóelemtől már részlegesen tisztult állapotban, ezeket oldottuk fel szobahőmérsékleten az IB-lízis oldatban, amely a következőket tartalmazta mM-ban: foszfát 30 (pH 7.8, NaOH), NaCl 200, PMSF 1, benzamidin 0.1, β-merkaptoetanol 5, imidazol 5, urea 7000. A TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérjét Ni-NTA agarózzal tisztítottuk ebből az oldatból. A rezint szobahőmérsékleten mostuk háromszor 50 mM imidazollal kiegészített IB-lízis oldattal, majd egyszer IB-lízissel, majd kétszer pH 5.5-re titrált IB-lízissel, majd újra IB-lízis oldattal. A TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérjét Ni-NTA rezinen immobilizálva tároltuk kb. 50 %-os szuszpenzióban IB-lízis oldatban 4 °C-on.

A fent bemutatott általános vonalakban leírt tisztítási eljárásokat az egyes kísérletekben a tisztított fehérje egyedi tulajdonságainak megfelelően adaptáltuk.

#### **4.6 *In situ* hibridizáció**

A Kv8.2 egyedi N-terminálisának megfelelő mintegy 300 bp hosszúságú cDNS-t sokszoroztunk polimeráz láncreakció (PCR) segítségével a teljes csatorna kódoló régiót tartalmazó pXEN plazmidből. A PCR terméket Bluescript II pKS vektorba szubklónoztuk, az EcoRI és EcoRV helyek közé. Ebből a plazmidből sokszoroztuk PCR-ral a szonda (probe) templátot, T7 és T3 oligonukleotidokkal. Erről a templátról T7 vagy T3 RNS polimerázzal radioaktívan jelölt szenz vagy antiszenz RNS szondát szintetizáltunk *in vitro*, MaxiScript kit segítségével (Ambion).

Kollaborációs partnerünk, dr. Tóth E. Zsuzsanna, a szöveteket (egér szem és újszülött patkány) fagyasztva metszés (kriosztát) után 4% formaldehiddel fixálta. Dehidráls és delipidálást követően, 55 °C-on 10<sup>6</sup> cpm radioaktívan jelölt szenz vagy antiszenz szondával hibridizáltatta a metszeteket egy éjszakán át, majd RNáz A tartalmú oldattal többször mosta ezeket. Az újra dehidrált és szárított metszeteket "radioaktív nyomjelzőbe" (NTB3 nuclear track emulsion) mártotta, majd 10 nap expozíciót követően Kodak Dektol-lal előhívta.

#### 4.7 Immunoblot

A calcineurin és tubulin kimutatását standard Western blot eljárással végeztük. A denaturált mintákat 12 %-os SDS-PAGE géleken futtattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A nem specifikus kötőhelyeket 5 % sovány tejport és 1% Tween 20 detergenst tartalmazó oldattal blokkoltuk. Az elsődleges antitestek a nyúl poliklonális anti-calcineurin A (H-209, sc-9070, Santa Cruz Biotechnology) 500-szoros, illetve a monoklonális anti-β-tubulin IgG (Sigma T5076) 5000-szeres hígításban voltak. A második antitestek tormaperoxidáz-konjugált anti-nyúl vagy anti-egér IgG-k voltak kecskéből (R05071 vagy R05072, Advansta), 5000- vagy 10000-szeres hígításban. A csíkokat erősített kemilumineszcencia módszerrel tettük láthatóvá (WesternBright ECL HRP, Advansta). A Phos-tag kísérleteknél használt anti-HA immunoblot leírását ld. a 4.11 fejezetben.

#### 4.8 GST és His<sub>6</sub>/His<sub>8</sub> "pulldown" kísérletek

A rezinen immobilizált fúziós fehérjék, illetve azok különböző mutáns változatainak, fehérje interakcióit "pulldown" kísérletekkel vizsgáltuk. Az interakciós partner jelöletlen, vagy a csalifehérjétől eltérő fúziós címkével jelölt, tisztított rekombináns változatát hosszan (általában 1 h) együtt inkubáltuk a rezinen immobilizált csalifehérjével a kötődés elősegítésére. A nem specifikus interakciókat (pl. az oldatban lévő fehérje rezinhez tapadását) detergens (pl. Triton X-100 vagy CHAPS) hozzáadásával mérsékeljük. Ezt követően a rezint gyorsan (jellemzően néhány percen belül) és többször mostuk fehérjementes

oldattal, a nem kötődő fehérjék eltávolítására, majd a rezinről a kötődő fehérjéket ureával vagy az összes fehérjét (beleértve a csalifehérjét is) SDS mintapufferrel eluáltuk. Az eluátumokból a fehérjéket Tris-Gly SDS-PAGE gélelektroforézissel szétválasztottuk méret szerint, majd leggyakrabban Coomassie Blue festéssel láthatóvá tettük. Ritkábban ezüst festést kellett alkalmaznunk a nagyobb érzékenység elérésére, vagy a fehérjét specifikus antitest felhasználásával Western blot kísérlettel mutattuk ki. A megfelelő kontrollt leggyakrabban a csak rezinnel végzett reakció, vagy a "vad típusú" és különböző mutáns csalifehérjék kötésének összehasonlítása jelentette.

A 14-3-3 kötés vizsgálatánál a TRESK hurok régiónak megfelelő csalifehérjéket *in vitro* foszforiláltuk a "pulldown" kísérlet előtt, mivel a 14-3-3 foszforiláció-függő kötődést mutat. Ilyenkor a GST vagy His<sub>8</sub> fúziós fehérjét egy éjszakán át együtt inkubáltuk protein kináz A holoenzimmel (PKA, Sigma) a megfelelő összetételű oldatban, amely a szokásos proteáz inhibitorokon kívül foszfataz gátlókat és természetesen ATP-t és cAMP-t is tartalmazott a megfelelő koncentrációban. A TRESKloop-His<sub>8</sub> csalifehérjénél a PKA reakció előtt többszöri mosással eltávolítottuk a tároló oldatban található ureát.

A "pulldown" kísérletek egyes eseteiben szöveti (egér agy) citoszolból halásztuk ki az interakciós partnereket a fent ismertetett általános eljáráshoz hasonló módon.

#### 4.9 *In vitro* fehérje foszforiláció vizsgálat

A rezinen immobilizált fúziós fehérjék foszforilációját vizsgáltuk *Xenopus* ovárium vagy egér agy citoszol, illetve protein kináz A (PKA, Sigma) vagy a rekombináns konstitutívan aktív MARK2 konstrukció hatására.

A *Xenopus* ovárium szövet citoszol készítéséhez 1 g szövetet homogenizáltunk 1 ml oldatban, amely mM-ban tartalmazta a következő összetevőket: HEPES 50 (pH 7.2, NaOH), KCl 50, MgCl<sub>2</sub> 10,  $\beta$ -glicerofoszfát 50, NaF 20, para-nitrofenilfoszfát 20, nátrium ortovanadát 0.2, PMSF 2, benzamidin 0.2,  $\beta$ -merkaptoetanol 2, imidazol 10, és ezt kiegészítettük a következőkkel: ciklosporin A (5  $\mu$ M), FK506 (1  $\mu$ M), leupeptin (0.5 mg/ml), aprotinin (0.5 mg/ml) és szójabab tripszin inhibitor (1 mg/ml, Sigma, type IIS). A

lizátumot háromszor centrifugáltuk 16000 g-vel 10 percig és minden alkalommal a középső fázist vittük tovább, amely az oldhatatlan pellet felett és a felszíni lipid alatti felülúszó folyadék fázist jelenti. A tiszta felülúszót 200  $\mu$ l Ni-NTA agarózzal preinkubáltuk 4 °C-on, a rezinhez nem specifikusan kötő fehérjék eltávolítására. A 12-25  $\mu$ l Ni-NTA rezinen immobilizált TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérjét háromszor mostuk 1 ml oldattal (mM: HEPES 50 (pH 7.2, NaOH), KCl 50, PMSF 1, benzamidin 0.1,  $\beta$ -merkaptotanol 2) 20 percig. Az immobilizált TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérjét 40 percig foszforiláltattuk 100  $\mu$ l ovárium citoszol és 1 MBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP jelenlétében, folyamatos rázatás mellett. A nem beépült radioaktivitás elmosását követően a fehérjét eluáltuk mintapufferrel és 15%-os SDS-PAGE gélen futtattuk. A géleket megfestettük Coomassie Blue festékkel és a radioaktivitásukat GS-525 Phosphor imager (Bio-rad) készülékkel leképeztük.

A fehérje konstrukciókat protein kináz A-val (Sigma, P5511, 0.7 U/ $\mu$ g, 1  $\mu$ g/reakció) olyan oldatban foszforiláltuk 37 °C-on 30 percig, amely a következőket tartalmazta mM-ban: HEPES 20 (pH 7.5, NaOH), KCl 80, MgCl<sub>2</sub> 10,  $\beta$ -glicerofoszfát 25,  $\beta$ -merkaptotanol 0.5, nátrium ortovanadát 0.1, cAMP 1, és ezt kiegészítettük a következőkkel: 50  $\mu$ M Na<sub>2</sub>ATP és 50 kBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP.

Az egér agy citoszol készítéséhez egy egér agyát homogenizáltuk 1.2 ml oldatban, amely a következő összetevőket tartalmazta mM-ban: Tris-HCl 40 (pH 7.6), PMSF 2, benzamidin 0.5,  $\beta$ -merkaptotanol 9. A lizátumot centrifugáltuk 35000 g-vel 20 percig, kiegészítettük 100 mM NaCl-dal és újra centrifugáltuk 35000 g-vel 10 percig. A felülúszót Sephadex G-25 géliszűrő oszlopra (1.5 cm átmérőjű, 23 cm magas) vittük fel ÄKTA-FPLC rendszerrel, miután az oszlopot ekvilibráltattuk olyan oldattal, amely mM-ban tartalmazta a következő összetevőket: Tris-HCl 40 (pH 7.6), PMSF 0.5, benzamidin 0.5,  $\beta$ -merkaptotanol 2. Az átfolyóból a 280 nm-en mért magas extinkciójú és egyben alacsony vezetőképességű frakciókat gyűjtöttük, amelyek a só és ATP mentes fehérjének feleltek meg. A gél-filtrált citoszolt nyolcszorosára hígítottuk az oszlop ekvilibráló oldatával és ebből adtunk 10  $\mu$ l-t 10  $\mu$ l Ni-NTA rezinhez, amely az immobilizált TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérjét tartalmazta. Ezt inkubáltuk 37

°C-on 1 óráig 40 µl olyan oldat hozzáadása után, amely a következő összetevőket tartalmazta mM-ban: HEPES 60 (pH 7.4, NaOH), KCl 50, MgCl<sub>2</sub> 10, imidazol 75, β-glicerofoszfát 20, β-merkaptoetanol 4, nátrium ortovanadát 0.2, és ezt kiegészítettük a következőkkel: 1% Triton X-100, 20 µM Na<sub>2</sub>ATP és 50 kBq [γ-<sup>32</sup>P]ATP. A fehérjéket eluáltuk, futtattuk és a radioaktivitást hasonlóan mértük, ahogy fentebb már leírtuk.

A GST-TRESKloop és GST-tau konstrukciókat a Trx-His<sub>6</sub>-MARK2-T208E tisztított rekombináns kinázzal foszforiláltattuk, mivel ez a konstrukció nem kötődött számottevően a glutation rezinhez és konstitutívan aktív volt, vagyis nem igényelt aktiváló foszforilációt a T208 pozícióban. A foszforilációt 30 °C-on 1 óráig végeztük folyamatos rázatás (200 rpm) mellett olyan oldatban, amely a következő összetevőket tartalmazta mM-ban: Tris-HCl 50 (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 5, PMSF 0.5, benzamidin 0.5, EGTA 2, DTT 0.5, kiegészítve 20 µM Na<sub>2</sub>ATP-vel és 100 kBq [γ-<sup>32</sup>P]ATP-vel.

A különböző Ni-NTA rezinen kötött TRESKloop-His<sub>8</sub> konstrukciókat viszont GST-MARK2-T208E tisztított rekombináns kinázzal foszforiláltattuk. Ebben az esetben a foszforiláló oldatból kihagytuk az EGTA-t és a DTT-t, mivel ezek inkompatibilisek a Ni-NTA rezinnel, a DTT helyett 1.4 mM β-merkaptoetanolt használtunk.

#### **4.10 *In vitro* foszfatáz mérések radioaktív jelölés eltávolítással**

A 10 µl glutation agarózon immobilizált GST-hTRESK(174-280), GST-hTRESK-(174-280)-AQAP, GST-mTRESK(164-292) és GST-mTRESK(164-292)-AQAP fúziós fehérjéket Trx-His<sub>6</sub>-MARK2-T208E kinázzal foszforiláltuk és ezáltal radioaktívan jelöltük foszforizotóppal, ahogy azt a 4.9 fejezetben ismertettük.

Ezt követően a radioaktívan jelölt fehérjéket egér agy citoszollal defoszforiláltuk különböző, 0 és 60 perc közötti időtartamokig. Az egér agy citoszolt hasonlóan készítettük, ahogy az előző (4.9) fejezetben olvasható, azzal a különbséggel, hogy egy agyat 4 ml oldatban homogenizáltunk. Ez megfelelően híg citoszolt eredményezett, a kalcineurin koncentráció jelentős

mértékben csökkent és annyira lelassult a defoszforiláció, hogy lehetővé vált a kinetika értékelése a 0-60 perces időtartományban.

Az egy agyból preparált citoszolt 18 defoszforilációs reakcióhoz használtuk fel (10 µl rezin/reakció). A különböző reakciókban a citoszolt megfelelően kiegészítettük 1 mM CaCl<sub>2</sub>-dal vagy 2 mM EGTA-val, a kalcineurin aktivitás elősegítésére (a citoszol tartalmazta a kalmodulint is) vagy gátlására. A reakciót a citoszol gyors hígításával állítottuk le, majd a szubsztrát fehérjét eluáltuk SDS-mintapufferrel a rezinről és futtattuk 12%-os SDS-PAGE gélen, festettük Coomassie Blue-val és a radioaktivitást leképeztük foszpor imagerrel.

#### 4.11 *In vivo* foszforiláció kimutatása Phos<sup>TM</sup>-tag reagenssel

A HA<sub>2</sub>-N70Q-hTRESK konstrukciót expresszáló *Xenopus* oocytákból a cRNS mikroinjektálása utáni harmadik napon plazmamembrán frakciót preparáltunk. (A módosított csatorna alegység két N-terminális HA-címkét, influenza hemagglutinin epitópot tartalmazott, ezért anti-HA antitesttel kimutatható volt Western blot kísérletben. Emellett az N70Q mutációval megakadályoztuk az N-glikozilációt, amely jelentős méretbeli heterogenitást okozott volna.) A sejteket (csoportonként 10-30 db) 1 ml lízis oldattal homogenizáltuk Potter homogenizálóban jégen. A lízis oldat összetétele mM-ban a következő volt: HEPES 20 (pH 7.9, NaOH), imidazol 40, nátrium ortovanadát 1, NaF 40, EDTA 10, PMSF 1, benzamidin 1, amelyet kiegészítettünk: foszfatáz inhibitor koktél (1. típusú, 1%, Sigma, P2850), leupeptin (5 mg/ml). A homogenizátumot kétszer centrifugáltuk 1000g-vel 10 percig 4 °C-on, ezzel eltávolítottuk a nagy mennyiségű szikanyag szemcsét. Majd a nagyméretű plazmamembrán darabokat lecentrifugáltuk 16000g-vel 10 perc alatt 4 °C-on és felvettük 40-80 µl SDS-mintapufferben. A plazmamembrán preparátumot azonnal felhasználtuk vagy -80 °C-on tároltuk.

Az egyik csoportban a membránpreparátumot *in vitro* defoszforiláltuk λ foszfatázzal (Santa Cruz). Itt a membrán frakcióhoz először 20 µl Mn<sup>2+</sup> tartalmú defoszforiláló puffert adtunk, amelynek összetétele mM-ban a következő volt:

HEPES 50 (pH7.5, NaOH), DL-dithiothreitol 7.5, EGTA 1.5,  $\text{MnCl}_2$  3. A fehérjét 2  $\mu\text{l}$   $\lambda$  foszfatázzal (400 U/ $\mu\text{L}$ ) defoszforiláltuk 37 °C-on egy óráig, majd a mintát felvettük SDS-mintapufferben.

A foszforilált és defoszforilált TRESK fehérjéket Phos-tag™ SDS-PAGE módszerrel választottuk szét egymástól. A futtatást 15  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag komplex jelenlétében 8%-os poliakrilamid gélen Tris-MOPS pufferrel végeztük a gyártó utasításának megfelelően (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japán). Egy sávba az SDS-mintapufferben felvett membrán frakciókból 5-10  $\mu\text{l}$ -t vittünk fel, amelyet kiegészítettünk megfelelő mennyiségű  $\text{ZnCl}_2$ -dal az EDTA telítésére és NaOH-dal a pH visszalúgosítása céljából. (A szabad EDTA és alacsony pH nem kompatibilis a Phos-tag futtatással.)

A gélből a fehérjéket blottoltuk nitrocellulóz membránra, majd a TRESK konstrukciót anti-HA antitesttel Western blot módszerrel detektáltuk. Miután blokkoltuk a nitrocellulóz membrán nem specifikus kötőhelyeit (foszfát pufferelt fiziológias sóoldatban oldott 0.2 g/10 ml szarvasmarha szérum albumin, 0.5 g/10 ml zsírmentes tejpor és 0.2 % Tween-20 detergens keverékével), egér monoklonális anti-HA IgG1 elsődleges antitesttel (10000-szeres hígítás, Clone 2-2.2.14, Thermo Scientific) inkubáltuk a membránt két óráig szobahőn. Ezután egy óráig inkubáltunk a másodlagos antitesttel, tormaperoxidázzal (HRP, horseradish peroxidase) konjugált, kecske anti-egér IgG-vel (10000-szeres hígítás, R-05071-500; Advansta). A membránt egyszer mostuk 5-10 percig a blokkolás után és 4-6-szor az antitestek eltávolítására, 20-30 ml 0.1% Tween-20-at tartalmazó foszfát pufferelt fiziológias sóoldatban. A TRESK csíkokat fokozott kemilumineszcenciával jelenítettük meg a gyártó utasítását követve (WesternBright ECL HRP, Advansta).

#### 4.12 Statisztikai analízis

Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag hibája (standard error of the mean, S.E.M.) formában adtam meg. A különbségeket minden esetben  $p < 0.05$  érték alatt fogadtuk el szignifikánsnak, de ha a  $p$  érték ennél kisebb volt, akkor ezt adtam meg a szövegben (pl.  $p < 0.01$ ). Az alacsonyabb  $p$  értéket az ábrákon általában több csillaggal jeleztem. A kísérleti modellnek megfelelően határoztuk meg a

használt statisztikai teszt típusát, emellett egyes esetekben a kísérletből származó adatok tulajdonságait is figyelembe vettük előre rögzített algoritmus szerint (az adatok normál eloszlását a Shapiro-Wilk teszttel, vagy a varianciák homogenitását Levene teszttel vizsgáltuk). A parametrikus tesztek közül gyakran használtuk a Student t-tesztet vagy a heteroszkedasztikus Welch-Satterthwaite korrigált t-tesztet, illetve több minta összehasonlítására az egyutas (Fisher) ANOVA-t követően a Scheffe vagy Tukey HSD poszt hoc tesztet, vagy a Welch ANOVA-t és a Games-Howell poszt hoc tesztet. A nem parametrikus tesztek közül leggyakrabban a Mann-Whitney U tesztet vagy a Kruskal-Wallis ANOVA-t alkalmaztuk. A statisztikai számításokat a Statistica szoftver (TIBCO Software) vagy SPSS Statistics szoftver (IBM Corporation) különböző verzióival végeztük. Teljes gátlás esetén a normalizált dózis-hatás összefüggéseket a  $1/(1+(c/K_{1/2})^n)$  Hill-egyenlettel illesztettem, részleges gátlásnál az egyenlet  $\alpha/(1+(c/K_{1/2})^n)+(1-\alpha)$  változatát használtam, amelyben az  $\alpha$  a gátolt hányadnak felel meg (a  $c$  a gátlószer koncentrációja,  $K_{1/2}$  a félmaximális gátló koncentráció, az  $n$  pedig a Hill-koefficiens). A denzitometriás adatokat az ImageJ szoftverrel (Wayne Rasband, NIH, Research Services Branch) értékeltem.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 A TRESK és Kv8.2 gének azonosítása a humán genomban

Egy saját fejlesztésű számítógép programmal új, korábban ismeretlen kálium csatorna géneket azonosítottam a 2000-es évek elején még nem annotált humán genom szekvenciájában. A kromoszomális DNS-ek hat leolvasási keretében olyan szekvencia részleteket kerestem, amelyek aminosavakra lefordítva jól megfeleltek a már ismert K<sup>+</sup> csatornák konzervált pórusdoménjének. A számított aminosav szekvenciákhoz pontszámokat rendeltem az egyes DNS pozícióknak és leolvasási kereteknek megfelelően, aszerint, hogy mennyire hasonlítanak a korábban ismert K<sup>+</sup> csatorna pórusdomén szekvenciákból képzett konszenzus motívumhoz. A magas pontszámot adó szekvenciák között számos már ismert K<sup>+</sup> csatorna génjét megkaptam, azonban ezek mellett két korábban még nem közölt szekvenciát is sikerült azonosítani (15. ábra).

|    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |
|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| L  | D  | F  | E  | N  | A  | F  | Y  | F | C | F | V | T | L | T | T | I | G | F | G | D | T | V | L | E | H | P | N  | F  |
| -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  |
| 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| W  | -  | Y  | P  | -  | A  | L  | W  | W | - | I | T | T | M | T | T | V | G | Y | G | D | Y | V | A | - | T | - | G  | G  |
|    |    | F  |    |    | S  | F  | F  | F |   |   | V | V | L | L | S | I |   | F |   | H |   | P |   |   |   |   |    |    |
|    |    |    |    |    |    | Y  |    |   |   |   | I | I | I | S |   |   |   | L |   | N |   |   |   |   |   |   |    |    |
|    |    |    |    |    |    | L  |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |
|    |    |    |    |    |    | I  |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |

**15. ábra: Az egyik K<sup>+</sup> csatorna aminosav szekvenciájának egyezése a pórusdomén konszenzus motívummal**

A konszenzus motívumot a már korábban ismert K<sup>+</sup> csatornák pórusdomén szekvenciája alapján empirikusan képeztem a GYG motívum első glicinjét megelőző 17 és azt követő 11 aminosav figyelembevételével (5 kihagyással). A GYG motívumhoz (*piros téglalap*) relatív pozíciót a táblázat 2. és 3. sora adja meg, alatta szerepelnek az adott pozícióban gyakran előforduló aminosavak (többségében *szürkével*). A táblázat első sorában az újonnan azonosított szekvenciát és az egyezéseket a konszenzus motívumban *sárgával* jelöltem. A vizsgált 24 pozíció közül a TRESK szekvenciája 16 helyen egyezett a konszenzussal. (Nem közölt eredmény.)

A két új gén exon-intron szerkezetét az FGENESH internetes eszközzel (Softberry website) jósoltam és a hipotetikus cDNS-eket összeállítottam. Az egyik csatorna alegység négy transzmembrán szegmenst és két pórusdomént (4TMS/2P) tartalmazott (ma TRESK néven ismerjük), a másik pedig a

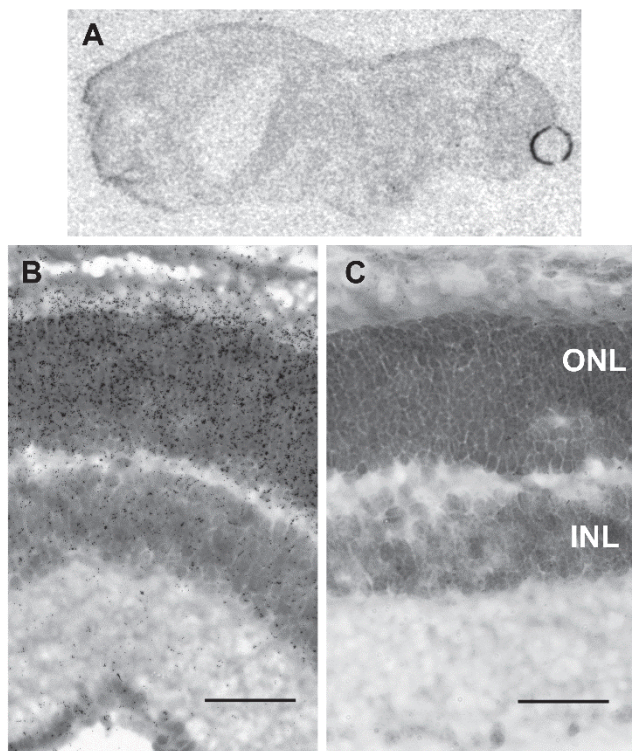
feszültségfüggő  $K^+$  csatornákra jellemző 6TMS/1P szerkezetet mutatta (ma Kv8.2).

Nem találtunk olyan humán cDNS könyvtárat vagy szöveti RNS-t, amelyből a TRESK kódoló régiót (RT-)PCR segítségével sokszorosítani lehetett volna. Ezért a humán genomiális DNS-ből sokszorosított exonokat építettük össze. Ez működő csatornát eredményezett és pontosan megegyezett a Sano és mtsai. által közölt, gerincvelőből sokszorosított humán TRESK (**TWIK-RElated Spinal cord  $K^+$  channel**) cDNS-sel [1]. Közben az egér genom szekvenciája is hozzáférhetővé vált, ennek ismeretében RT-PCR módszerrel kisagyból amplifikáltuk az egér TRESK szekvenciát, amelyet elsőként közöltünk [2]. Eredményünket hamar megerősítette egy harmadik munkacsoport, akik az egér csatornát TRESK-2 néven publikálták [3]. A humán TRESK szekvenciától, az egyéb  $K_{2P}$  csatornáknál megszokottnál jóval nagyobb mértékben, eltér az egér TRESK szekvenciája (az aminosav azonosság mintegy 65 %), ezért gondolták, hogy másik gént találtak. Később nyilvánvalóvá vált, hogy nem történt génduplikáció és mindkét fajban csak egyetlen TRESK gén létezik. A másik két munkacsoport első kísérleteiben nem vizsgált receptor-függő szabályozást, ezért a TRESK egyedi kalcium-függő aktivációját elsőként írtuk le az irodalomban [2]. (Ld. a további fejezetekben.)

A másik azonosított, feszültségfüggő  $K^+$  csatorna alegység (Kv8.2) kódoló szekvencia részletét megtaláltuk az EST (expressed sequence tag) adatbázisban és az egér retina eredetű BG342392 EST klónt megvásároltuk. Ez azonban nem tartalmazta a teljes kódoló régiót, ezért a cDNS 5' végét RT-PCR módszerrel sokszorosítottuk egér szem totál RNS-ből és az EST klónnal összeépítettük. A feszültségfüggő  $K^+$  csatorna alegység első klónozását, akkor még Kv11.1 néven, korán leírta egy másik munkacsoport [261]. Ennek ellenére tovább folytattuk a  $K_v$  alegység vizsgálatát, mert a másik munkacsoport nem közölte a csatorna alegység lokalizációját a szemben, amely nekünk feltűnt és érdekesnek találtuk.

A Kv8.2 retina EST és a szemből sokszorozott PCR fragmens sugallta a csatorna lokalizációját, de erről pontosabban is megbizonyosodtunk [262]. Kollaborációban dr. Tóth E. Zsuzsannával a Semmelweis Egyetem Anatómiai

Intézetben, radioaktívan jelölt *in situ* hibridizációs próbát szintetizáltunk és megvizsgáltuk a csatorna mRNS kifejeződést újszülött patkány teljes test paraszagittális metszeten (16. ábra, A panel).



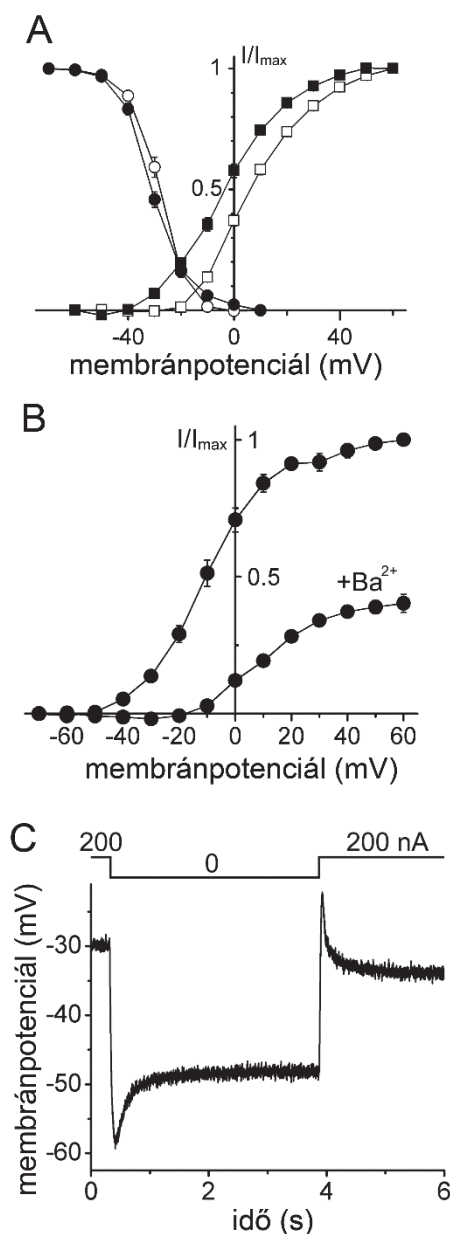
**16. ábra: A Kv8.2 feszültségfüggő K<sup>+</sup> csatorna alegység *in situ* hibridizációs vizsgálata.**

**A.** Teljes újszülött patkány paraszagittális metszet *in situ* hibridizáció Kv8.2-re specifikus radioaktívan jelölt antiszenz RNS próbával. Csak a szem mutat specifikus jelölődést.

**B.** Egér retina metszet Kv8.2 *in situ* hibridizációs autoradiogram. A külső sejtmag réteg (ONL) mutat nagy szemcsesűrűséget. **C.** Kontroll *in situ* hibridizáció Kv8.2 szenz RNS próbával. (INL: belső sejtmag réteg, a lépték 50  $\mu$ m-t jelöl.) Módosítva a [262] közleményből.

A Kv8.2 mRNS nagy mennyiségben kifejeződik a retinában, a külső sejtmag rétegben, a fotoreceptorokban található (16. ábra, B és C panel). A lokalizáció mellett vizsgáltuk a funkciót is. A Kv8.2 magában kifejezve nem adott áramot *Xenopus* petesejtben, de ha a Kv2.1 alegységgel koexpresszáltuk, akkor a Kv2.1 homotetramertől eltérő tulajdonságú heteromer csatornák jelentek meg. A steady-state aktiváció feszültségfüggése a negatívabb potenciál értékek felé tolódott, változatlan inaktivációs feszültségfüggés mellett, és ez a -20 mV körüli tartományban fenntartott áramot ("window current") eredményezett (17.A ábra). Az áram gátlódott 5 mM Ba<sup>2+</sup> hatására és mutatta az aktiváció feszültségfüggésének pozitívabb irányba tolódását (17.B ábra), amelyet a fotoelektromos transzdukcióban fontos I<sub>KX</sub> K<sup>+</sup> áram megkülönböztető jellemzőjeként írtak le tigrisszalamandra pálcika fotoreceptor sejtben [263,264]. Mindemellett, current-clamp kísérletekben a Kv2.1/Kv8.2 heteromert kifejező petesejtekben, a 200 nA-es depolarizáló áram kikapcsolásakor hiperpolarizáló túllövés jött létre [262] (17.C ábra, ilyen túllövés nem alakult ki a csak Kv2.1-et

kifejező sejtekben). Ez a mechanizmus fontos a jelerősítésben a fotoreceptor sejtekben, mikor a megvilágítás hatására hirtelen csökken a "sötét áram" (dark current) a CNG (cyclic nucleotide-gated) csatornák záródása miatt. Munkánk közben Wu és mtsai. közölték a genetikai vizsgálataik eredményét, miszerint a Kv8.2-t kódoló KCNV2 gén mutációi emberben "szupernormális pálcika elektroretinogrammal járó csap disztrófiát" okoznak [265]. Ezen a ponton a Kv8.2 vizsgálatát befejeztük és elsőként közöltük, hogy eredményeink egybehangzóak azzal a hipotézissel, miszerint az emlős fotoreceptor sejtekben a Kv2.1/Kv8.2 heteromer csatornák a fototranszdukcióban szereplő  $I_{KX}$   $K^+$  áram molekuláris megfelelői [262].



### 17. ábra: A Kv8.2 alegység funkcionális jellemzése

*Xenopus* petesejtekben Kv2.1 homotetramer csatornákat fejeztünk ki vagy a Kv2.1 és Kv8.2 alegységeket koexpresszáltuk. Két-elektrodos voltage clamp (A, B) vagy current clamp (C) módszerrel mértünk.

**A.** A  $K^+$  áram steady-state aktivációjának (□, ■), és inaktivációjának (○, ●) feszültségfüggése a Kv2.1-et kifejező (□ (n=19), ○ (n=8)), vagy Kv2.1-et és Kv8.2-t koexpresszáló (■ (n=11), ● (n=5)) petesejtekben.

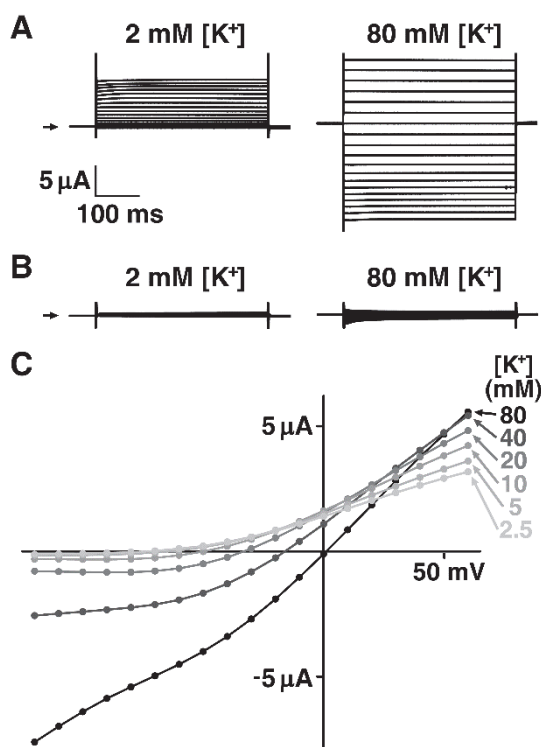
**B.** A Kv2.1/Kv8.2 áram steady-state aktivációjának feszültségfüggése 5 mM  $Ba^{2+}$  hiányában (*felső függvény*) és jelenlétében (*alsó függvény*, " $+Ba^{2+}$ ", n=6, másik pete preparátum, mint az A panelen). A csatornákat különböző potenciálokon aktiváltuk 200 ms-ig, majd -40 mV-on mértük a lecsengő áram amplitúdókat ("tail current"). Ezeket normalizáltuk a maximum értékre, amely  $Ba^{2+}$  hiányában a +60 mV-os aktiváció után jelentkezett.

**C.** Reprezentatív két elektrodos current clamp mérés egy Kv2.1-et és Kv8.2-t koexpresszáló oocytából. Miután a fenntartott 200 nA-es befelé irányuló stimuláló áram hatására -30 mV-on stabilizálódott a membránpotenciál, az áramot hirtelen ki-, majd visszakapcsoltam (a Warner OC-725C erősítőnek nem része a két-elektrodos current clamp elektronika, ezt saját kezűleg építettem ehhez a kísérleti tervemhez). A stimuláló áram hirtelen csökkentése a membránpotenciál hiperpolarizációjának túllövését hozta létre kb. -60 mV-ig, majd az áram tartós hiányában a membránpotenciál -50 mV értéken stabilizálódott. Módosítva a [262] közleményből.

Öt évvel később eredményeinket humán Kv2.1 és Kv8.2 alegységek koexpressziójával HEK-293 heterolog rendszerben megerősítette egy másik munkacsoport [266]. A közelmúltban rézuszmajom retina csapok és pálcikák K<sup>+</sup> áramának mérése alapján, illetve egér, rézus és humán retina immunhisztokémiai vizsgálatával egy másik munkacsoport arra a következtetésre jutott, hogy a főemlős fotoreceptor I<sub>KX</sub> késői rektifikáló K<sup>+</sup> áramot Kv2.1/Kv8.2 és Kv2.2/Kv8.2 heteromer csatornák hozzák létre [267]. Mindkét tanulmány többszöri hivatkozással tételesen tárgyalja a 2007-ben közölt eredményeinket.

## 5.2 A TRESK funkcionális expressziója *Xenopus* petesejtben

A TRESK expresszió a K<sub>2P</sub> csatornákra jellemző háttér K<sup>+</sup> áramot idéző *Xenopus* petesejtben (18. ábra). Az áram a feszültséglépések során látszólag pillanatszerűen aktiválódik és fenntartott depolarizáció hatására nem inaktiválódik (18.A ábra). Alacsony (2.5 mM) extracelluláris K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatban lényegében csak kifelé irányuló áram jelentkezik, azonban magas (80 mM) EC [K<sup>+</sup>]-ban a feszültség-áram összefüggés jó közelítéssel egy origón átmenő egyenesnek adódik (18.C ábra).



**18. ábra: A TRESK makroszkópos háttér K<sup>+</sup> áram elektrofiziológiai tulajdonságai**

**A.** Reprezentatív K<sup>+</sup> áramok egy egér TRESK csatornát kifejező *Xenopus* petesejtből. A TRESK áramot alacsony (2 mM) vagy magas (80 mM) extracelluláris K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatban mértem, -120 és +60 mV közötti, 10 mV-onként növekvő feszültséglépésekkel. A nulla áramot a bal oldalon nyíl jelöli.

**B.** Kontroll, desztillált vízzel injektált petesejt áramai azonos körülmények között, megegyező lépték mellett ábrázolva.

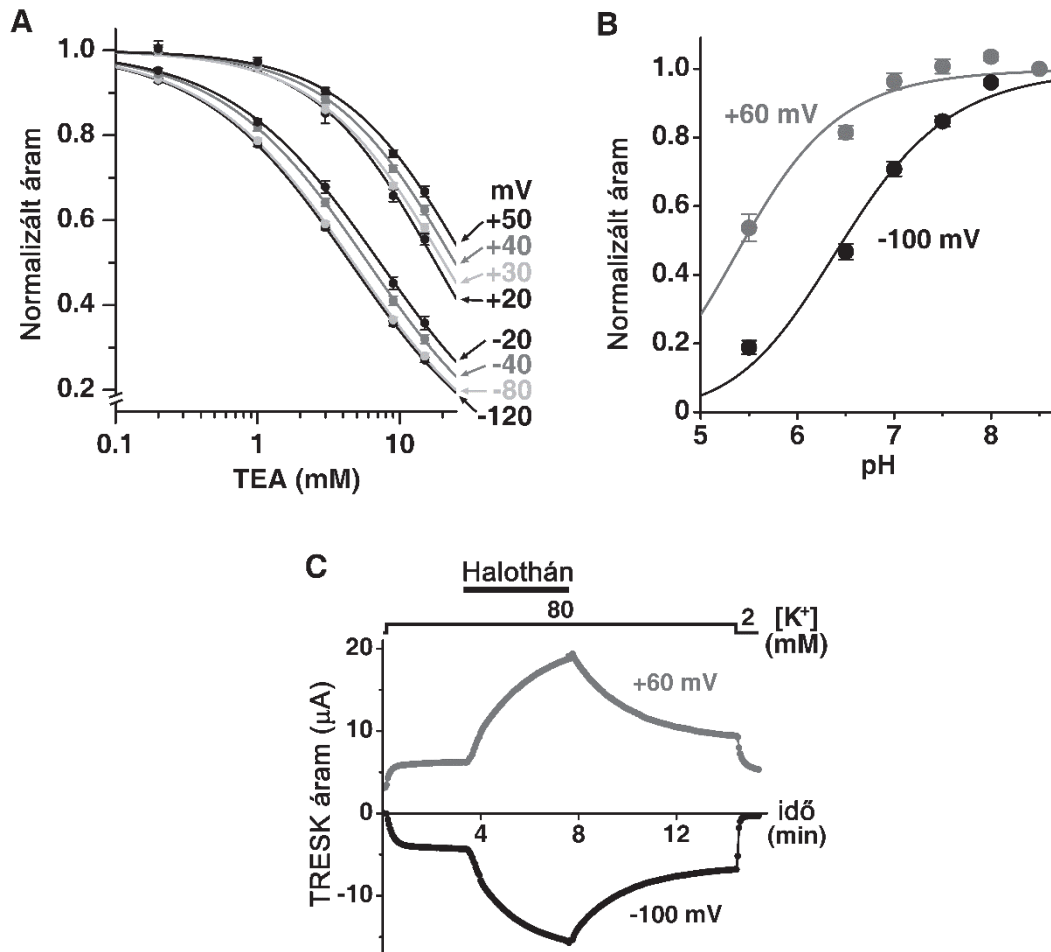
**C.** Reprezentatív TRESK feszültség-áram összefüggések különböző extracelluláris K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatokban. A görbékeltérő szürkeárnyalatokban ábrázoltam, a megfelelő K<sup>+</sup> koncentrációk jobb oldalon olvashatók le. Az áramokat hasonló feszültséglépések végén mértem, mint az A panelen bemutatott kísérletben. (Nem publikált eredmény.)

A TRESK csatorna  $K^+$ -szelektív, mivel a megfordulási potenciál függése az EC  $[K^+]$ -tól ( $58.8 \pm 0.3$  mV/dekád,  $n=5$ ) jól megfelel a Nernst egyenletből számítottnak. Mindemellett a feszültség-áram összefüggések felhívják a figyelmet arra is, hogy a TRESK áram néhány tulajdonságában eltér a Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) elmélet által leírt ideális háttér  $K^+$  áram viselkedésétől. Az EC  $[K^+]$  növelése nemcsak az elektrokémiai gradiens változtatásán keresztül befolyásolja a TRESK áram nagyságát, hanem a  $K^+$  egyben aktiválja is a csatornát. Eltérően a GHK áramegyenlet által jósolt linearitástól, az EC  $[K^+]$  kétszeres emelése az erősen hiperpolarizált membránpotenciál értékeken több mint kétszeres áram növekedést okoz és emellett az EC  $[K^+]$  növelésére a kifelé irányuló áram is megnő az erősen pozitív feszültségeken (18.C ábra). Mindemellett a TRESK áram a "nyitott csatorna rektifikáció" mechanizmust meghaladó mértékben enyhe kifelé rektifikálást mutat. Ez megnyilvánul az origón átmenő (80 mM  $[K^+]$ ) függvény enyhe görbületében, illetve abban, hogy alacsonyabb  $[K^+]$  mellett a hiperpolarizáció fokozásakor már nem nő a befelé irányuló áram amplitúdó (18.C ábra). A  $K^+$  általi aktiváció és a látszólagos kifelé rektifikálás mechanizmusát nem vizsgáltuk tovább.

A  $K_{2P}$  csatornák áramát a 4-aminopiridin (4-AP) és tetraetil-ammonium (TEA) gátlószerek általában nem, vagy csak nagyon kevésbé gátolják. A TRESK áramra is ez jellemző, habár a 4-AP és TEA kifejt enyhe gátló hatást, a TEA különösen a negatív membránpotenciál értékeken (I. táblázat és 19. ábra).

**I. táblázat. A *Xenopus* petesejtekben kifejezett egér TRESK áram megmaradó hányada (%) különböző  $K^+$  csatorna gátlószerek jelenlétében. (80 mM EC  $[K^+]$ )**

| Gátlószer                  | -100 mV      | +60 mV       | n |
|----------------------------|--------------|--------------|---|
| TEA (3 mM)                 | $58 \pm 1$   | $94 \pm 1$   | 5 |
| 4-AP (3 mM)                | $70 \pm 3$   | $67 \pm 2$   | 6 |
| Anandamid (10 $\mu$ M)     | $79 \pm 3$   | $95 \pm 2$   | 8 |
| $Ba^{2+}$ (300 $\mu$ M)    | $58 \pm 3$   | $82 \pm 1$   | 6 |
| $Cs^+$ (3 mM)              | $41 \pm 1$   | $99 \pm 1$   | 6 |
| Halothán (1 mM, 1 min)     | $175 \pm 15$ | $159 \pm 8$  | 5 |
| Halothán (1 mM, 4 min)     | $245 \pm 30$ | $223 \pm 18$ | 5 |
| Quinine (100 $\mu$ M)      | $34 \pm 2$   | $24 \pm 3$   | 6 |
| Ruténium vörös (3 $\mu$ M) | $92 \pm 1$   | $95 \pm 1$   | 6 |



### 19. ábra: A TRESK áram TEA, pH és halothán érzékenysége

**A.** Az egér TRESK áramokat különböző membránpotenciálokban mértem (ld. a panel jobb oldalán), 80 mM EC [K<sup>+</sup>]-ban, különböző (0.2, 1, 3, 9, 15 mM) [TEA] jelenlétében, és a TEA nélkül mért értékre normalizáltam. **B.** A TRESK áramokat -100 és +60 mV-on mértem, 80 mM EC [K<sup>+</sup>]-ban, különböző pH értékeken, és a pH 8.5 mellett mért maximumra normalizáltam. (Az A és B panelen a görbéket Hill egyenlettel illesztettem.) **C.** A halothán (1 mM) hatását a TRESK áramra (*reprezentatív görbe*) 300 ms hosszú -100 és +60 mV-os feszültséglépések végén mértem 3 másodpercenként. Az EC [K<sup>+</sup>]-ot 2-ről 80 mM-ra változtattam, majd vissza, ahogy a grafikon fölött jelöltem. (Nem publikált eredmény.)

A TASK csatornák nem specifikus gátlószere, az anandamid (10 μM), lényegében nem hat a TRESK csatornára. A Ba<sup>2+</sup> és Cs<sup>+</sup> feszültségfüggő gátlást okoz aránylag magas koncentrációban (l. táblázat), csakúgy mint az egyéb K<sub>2P</sub> (pl. TASK-1 [200]) csatornákon. A nem szelektív K<sup>+</sup> csatorna gátló kinin (quinine) hat a TRESK-re is, aránylag magas (100 μM) koncentrációban. A TASK-3 [204], TREK-2 [235] és TRAAK [203] csatornákat gátló ruténium vörös gyakorlatilag nem hat a TRESK-re. A TRESK csatorna áramát csak erős pH

csökkenés gátolja, ennek fiziológias szerepe valószínűtlen (19.B ábra). A TRESK sokkal kevésbé pH-érzékeny, mint pl. a TASK csatornák azonos körülmények között [203]. Nagyon kifejezetten aktiválja viszont a TRESK áramot az inhalációs anesztetikum halothán (I. táblázat, 19.C ábra).

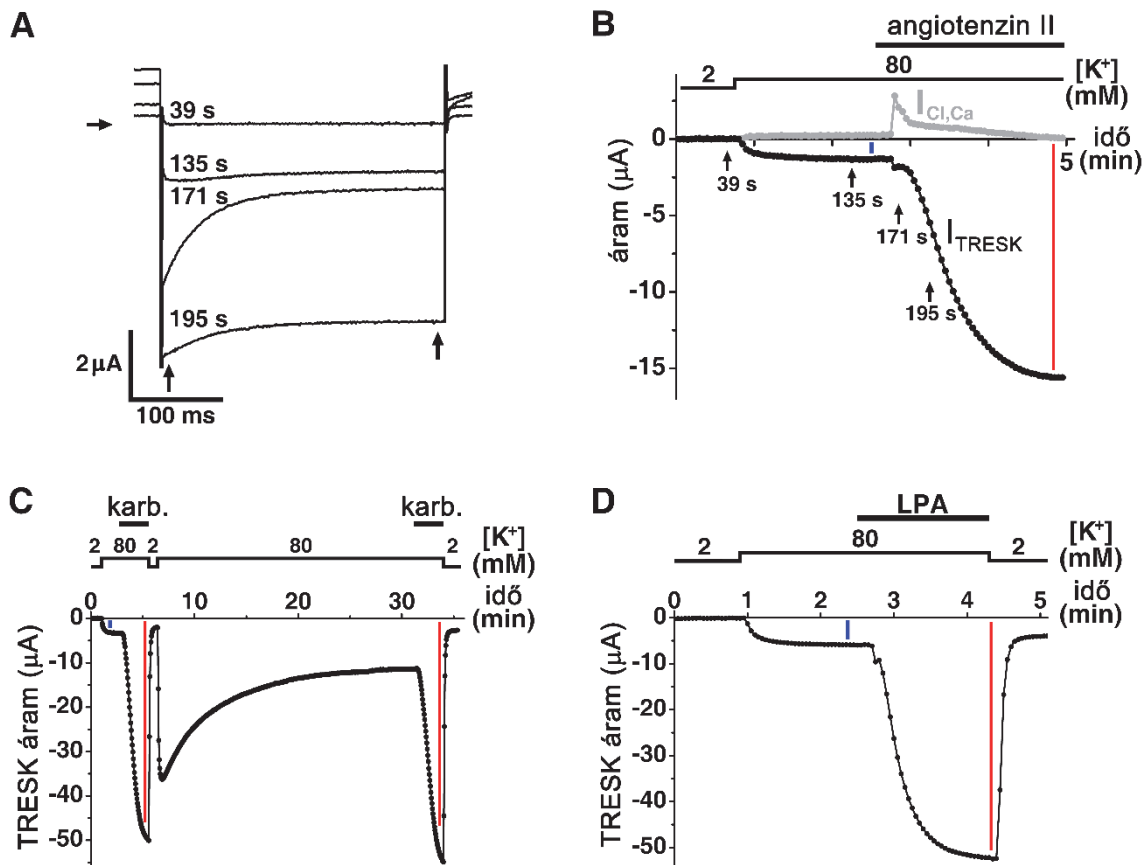
Összességében elmondható tehát, hogy a TRESK csatorna funkcionálisan kifejezhető *Xenopus* petesejtekben, jellegzetes háttér  $K^+$  áramot hoz létre, amelynek elektrofiziológiai és farmakológiai tulajdonságai több szempontból is jó összhangban vannak a  $K_{2P}$  csatornák jellemzőivel.

### 5.3 A kalcium-mobilizáló receptorok ingerlése aktiválja a TRESK-et

A  $K_{2P}$  csatornák szabályozása intracelluláris jelátviteli utakon keresztül rendkívül fontos a sejtek membránpotenciáljának és ingerlékenységének beállítása szempontjából. Ezért vizsgálni kezdtük, hogy a TRESK áram hogyan változik a különböző G-fehérje kapcsolt receptorok ingerlésének hatására. Ha a TRESK csatornát koexpresszáltuk  $AT_{1a}$  angiotenzin receptorral *Xenopus* petesejtben, akkor angiotenzin II (10 nM) hatására a háttér  $K^+$  áram hatalmas mértékben ( $13.3 \pm 1.9$ -szeresére,  $n=5$ ) növekedett (20. ábra, A és B panel) [2]. Nemcsak az  $AT_{1a}$  angiotenzin receptor, hanem más  $G_q$ -kapcsolt receptorok ingerlése is kiváltotta a TRESK aktivációt. Ha a TRESK csatornát  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptorral koexpresszáltuk és a receptort karbachollal (1  $\mu M$ ) ingereltük, akkor is létrejött a  $K^+$  áram nagyfokú ( $10.4 \pm 1.4$ -szeres,  $n=5$ ) növekedése (20.C ábra). A receptor ingerlés hatása reverzibilis volt, azonban a visszatérés a nyugalmi állapotba hosszú időt vett igénybe, pl. a reprezentatív 20.C ábrán 20 perc alatt még nem jött létre teljesen. Mindemellett a csatorna aktivációja receptor ingerléssel ismételhető volt (20.C ábra).

A fenti két kísérletben túlexpresszált receptorok ingerlésével hoztuk létre a nagyfokú TRESK aktivációt. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon mekkora csatorna aktiváció jön létre normális kifejeződési szintű receptor ingerlésének hatására. Ennek vizsgálatára a *Xenopus* petesejt endogén lizofoszfátidsav (LPA) receptorait ingereltük a csak TRESK csatorna cRNS-sel injektált sejtekben. Az LPA (0.5  $\mu M$ ) hatására  $7.6 \pm 2.5$ -szörös TRESK áram növekedés jött létre

( $n=6$ ); ez megközelítette a túlexpresszált receptorokkal kapott aktiváció mértékét (20.D ábra).



## 20. ábra: A $G_q$ -kapcsolt receptorok ingerlése aktiválja a TRESK csatornát

**A.** Reprezentatív áramok láthatók egér TRESK csatornát és  $AT_{1a}$  angiotenzin receptort koexpresszálo *Xenopus* petesejtéből. Az áramokat 10 nM angiotenzin II adása előtt és közben mértem, 3 másodpercenként ismétlődő -100 mV-os feszültséglépésekkel 0 mV tartópotenciálról, 2 vagy 80 mM EC  $[K^+]$ -ban. Az ingerlés különböző stádiumainak illusztrálására mindössze 4 görbét mutatok (39, 135, 171 és 195 s időpontokban). A nulla áramot egy vízszintes nyíl jelöli. **B.** A TRESK és endogén  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  ( $I_{Ca,Cl}$ ) áramokat ábrázoltam az idő, az extracelluláris  $[K^+]$  és az angiotenzin II-vel végzett ingerlés függvényében (ahogy a grafikon fölött jelöltem), ugyanabból a sejtéből, mint az A panelen. A TRESK áramot a feszültséglépés végén mértem (jobb oldali függőleges fekete nyíl az A panelen, fekete  $I_{TRESK}$  görbe a B panelen). A  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áramot a deaktiválódó áram komponens amplitúdójaként becsültem (az A panelen a jobb és bal oldali függőleges fekete nyilakkal jelölt áramok különbségeként, szürke  $I_{Ca,Cl}$  függvény a B panelen). **C.** TRESK csatornát és  $M_1$  muszkarinós acetilkolin receptort koexpresszálo petesejt áramait mértem karbachollal (1  $\mu$ M, *carb.*) végzett ismételt ingerlés közben. Az első ingerlést követően hosszú ideig vártam az áram visszatérését a nyugalmi (gátolt) állapotba. **D.** TRESK csatornát kifejező petesejtet ingereltem lizofoszfátidsavval (LPA, 0.5  $\mu$ M) az endogén LPA receptorokon keresztül. (A TRESK áram mérése és ábrázolása a C és D panelen hasonlóan történt, mint a B panelen. A illusztrációként szabadkézzel behúzott kék vonalak a TRESK nyugalmi, a pirosak pedig az aktivált áramot jelölik. Az A, B és D panelek nem publikált eredményt mutatnak, a C panelt a [2] közleményből módosítottam.)

A TRESK válasza pont az ellentéte annak, amit korábban a TASK-1 csatornánál tapasztaltunk, mivel a TASK-1 árama a  $G_q$ -kapcsolt receptor ingerlésére hasonló körülmények között erőteljesen gátlódott (11. ábra) [201]. Tudomásunk szerint mind a mai napig érvényes az a megállapítás, hogy a TRESK-en kívül az egyéb (emlős)  $K_{2P}$  csatornák áramát a  $G_q$ -kapcsolt receptorok ingerlése gátolja, vagy nem befolyásolja [2].

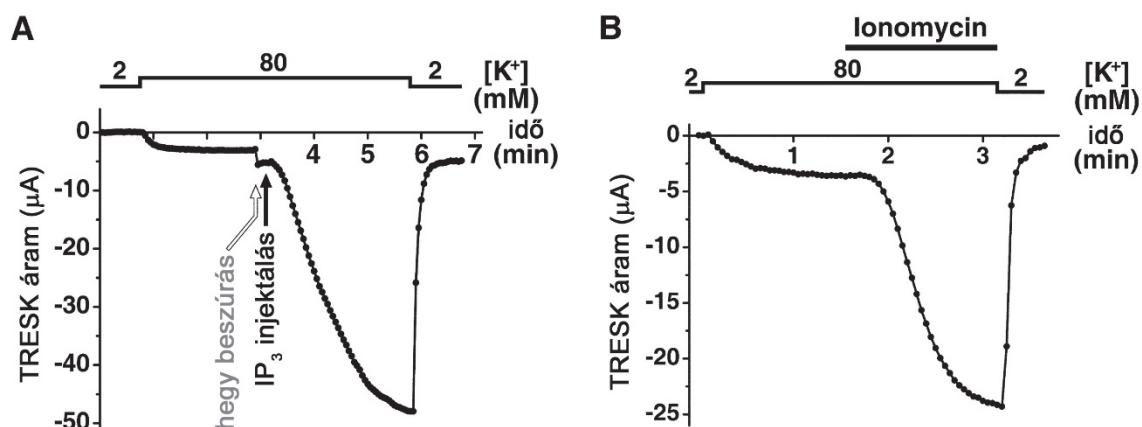
Szemben a fent említett három különböző  $G_q$ -kapcsolt receptor típussal, a TRESK csatornával koexpresszált  $G_i$ -kapcsolt  $M_2$  muszkarinos acetilkolin receptor ingerlése nem növelte a háttér  $K^+$  áram nagyságát (*nem mutatom*). A  $G_q$ -kapcsolt receptorok ingerlésére nemcsak az egér TRESK csatorna (20. ábra), hanem a humán TRESK is aktiválódott, ugyanabban az oocyta preparátumban gyakran még nagyobb mértékben, mint az egér TRESK ortológ (*nem mutatom*). Eredményeink tehát alátámasztják a következtetést, miszerint a kalcium-mobilizáló receptorok ingerlése aktiválja a TRESK csatornát.

#### 5.4 A citoplazma $[Ca^{2+}]$ növekedése felelős a TRESK aktivációért

A kalcium-mobilizáló hormon receptorok szerteágazó jelátviteli utakat indítanak meg, amelyek közül a két leginkább ismert közvetlen mechanizmus a kalcium felszabadítás az intracelluláris raktárakból inozitol-1,4,5-triszfoszfát ( $IP_3$ ) hatására, illetve a protein kináz C (PKC) konvencionális és "új-típusú" (novel) izoformáinak aktiválása diacilglicerinnel (DAG) által. Mint azonban a TASK-1 példáján is láttuk (2.2.2 fejezet), nem magyarázható minden csatornára kifejtett hatás a citoplazma  $[Ca^{2+}]$  növekedéssel és PKC aktiválódással. Kíváncsiak voltunk, hogy a nagyfokú receptor-mediált TRESK aktiválódásért milyen mechanizmus felelős.

Megvizsgáltuk, hogy az  $IP_3$  (10 ng) mikroinjektálása a petesejtbe mérés közben milyen hatást fejt ki a TRESK áramra (21. ábra, A panel). Az  $IP_3$  injektálás  $12.2 \pm 1.3$ -szorosára ( $n=5$ ) növelte a TRESK áramot, ami arra utal, hogy az  $IP_3$  szerepet játszik a receptor-függő TRESK aktivációban [2]. Ha az egér TRESK csatornát kifejező petesejteket a nem-specifikus PKC aktiváló PMA-val (100 nM, phorbol 12-myristate 13-acetate) kezeltük 2-3 percig mérés közben, akkor ez nem változtatta a háttér  $K^+$  áram nagyságát (*nem mutatom*).

Az ilyen PMA kezelésről kimutattuk, hogy létrehozza a PKC aktivációt azonos körülmények között a petesejtben (deszenzitizálta az expresszált AT<sub>1a</sub> angiotenzin receptort), ezért kijelenthetjük, hogy a gyors receptor-függő TRESK aktiváció (20. ábra) nem a PKC közvetítésével alakul ki. (Nem következik ebből azonban, hogy a PKC nincs hatással a TRESK csatornára. Jóval hosszabb időtartományban (30-60 min) a PMA aktiválja a humán TRESK csatornát, ld. alább.)



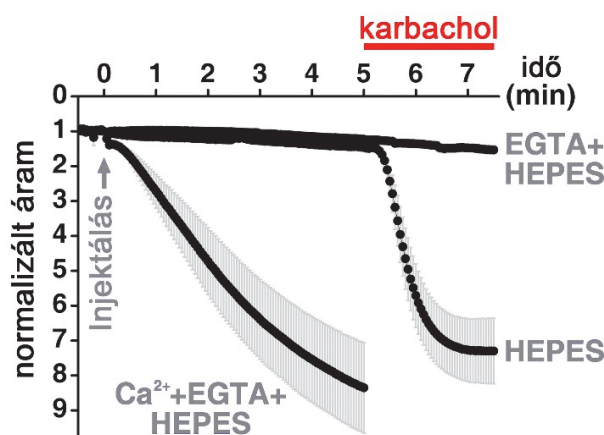
**21. ábra: Az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP<sub>3</sub>) mikroinjektálása és az extracelluláris oldalról adott kalcium-ionofór ionomycin egyaránt aktiválja a TRESK csatornát**

**A.** A két-elektrodos voltage clamp mérés közben IP<sub>3</sub>-at mikroinjektáltunk. Az egér TRESK csatornát kifejező *Xenopus* petesejtbe szúrtuk a mikroinjektáló kapilláris (hegy beszúrás, üres nyíl), amely egy kis nem specifikus csurgó (leak) áram növekedést okozott. Ezt követően 10 ng IP<sub>3</sub>-at injektáltunk 50 nl térfogatban, ami kifejezett TRESK áram növekedést eredményezett. A mérés végén az EC [K<sup>+</sup>]-ot 2 mM-ra csökkentettük, a mérés folyamán a nem specifikus csurgó áram nem fokozódott számottevően. **B.** Az egér TRESK csatornát kifejező petesejtet körüláramoltattuk a 0.5 μM ionomycint tartalmazó, magas (80 mM) K<sup>+</sup> koncentrációjú mérőoldattal (fekete vízszintes vonal a grafikon fölött). A mérés és ábrázolás módja megegyezik a 20. ábrán bemutatottal. Mindkét panelen reprezentatív regisztrátum látható. Módosítva a [2] közleményből.

Az IP<sub>3</sub> legtöbb (de nem minden) hatását a citoplazma [Ca<sup>2+</sup>] növelésén keresztül hozza létre. Ezért az IP<sub>3</sub>-tól függetlenül vizsgáltuk a kalcium szerepét a TRESK szabályozásban. Erre egyszerű megközelítést jelentett a kalcium ionofór ionomycin alkalmazása. Az ionomycin (0.5 μM) több petepreparátumban vizsgálva átlagosan 6.2 ± 0.4-szeresre (n=57, 21.B ábra) növelte az egér TRESK áramot. Az ionomycin hatását kivédte, ha magas koncentrációjú EGTA (50 mM, 50 nl) kalcium kelátort mikroinjektáltunk megelőzőleg a petesejtbe (*nem mutatott*). Mindezek mellett szólnak, hogy a TRESK aktiváció a citoplazma [Ca<sup>2+</sup>] növekedés miatt alakul ki. Mindazonáltal

az ionomycin hatásmechanizmusa aránylag összetett a petesejtben, mert az ionofór elsősorban a belső raktárból szabadít fel kalciumot és csak kisebb mértékben okoz kalcium beáramlást az EC térből [268,269], illetve később az a kép alakult ki, hogy a membránban halmozódó ionofór kismértékű közvetlen TRESK csatorna gátló hatást is kifejt [5]. Egyértelmű viszont az, hogy az ionomycin a receptor ingerlés által elindított komplex jelátviteli mechanizmusoktól függetlenül előidézte a kalcium-függő TRESK aktivációt. Ezért a későbbi kísérleteinkben az ionomycint rutinszerűen használtuk a kalcium-függő TRESK aktiváció kiváltására.

Szerettük volna a kalcium TRESK szabályozó hatását minél közvetlenebb módon igazolni, ezért megpróbáltuk  $\text{CaCl}_2$  oldat injektálásával aktiválni a csatornát. A néhány mM-os oldat azonban nem hatott (talán a citoplazma kalcium pufferelő hatása, vagy az intenzív kalcium eltávolító mechanizmusok miatt), magasabb koncentráció pedig elpusztította a sejtet. Ezért kalciummal telített EGTA puffer mikroinjektálásával aktiváltuk a TRESK csatornát (22. ábra).

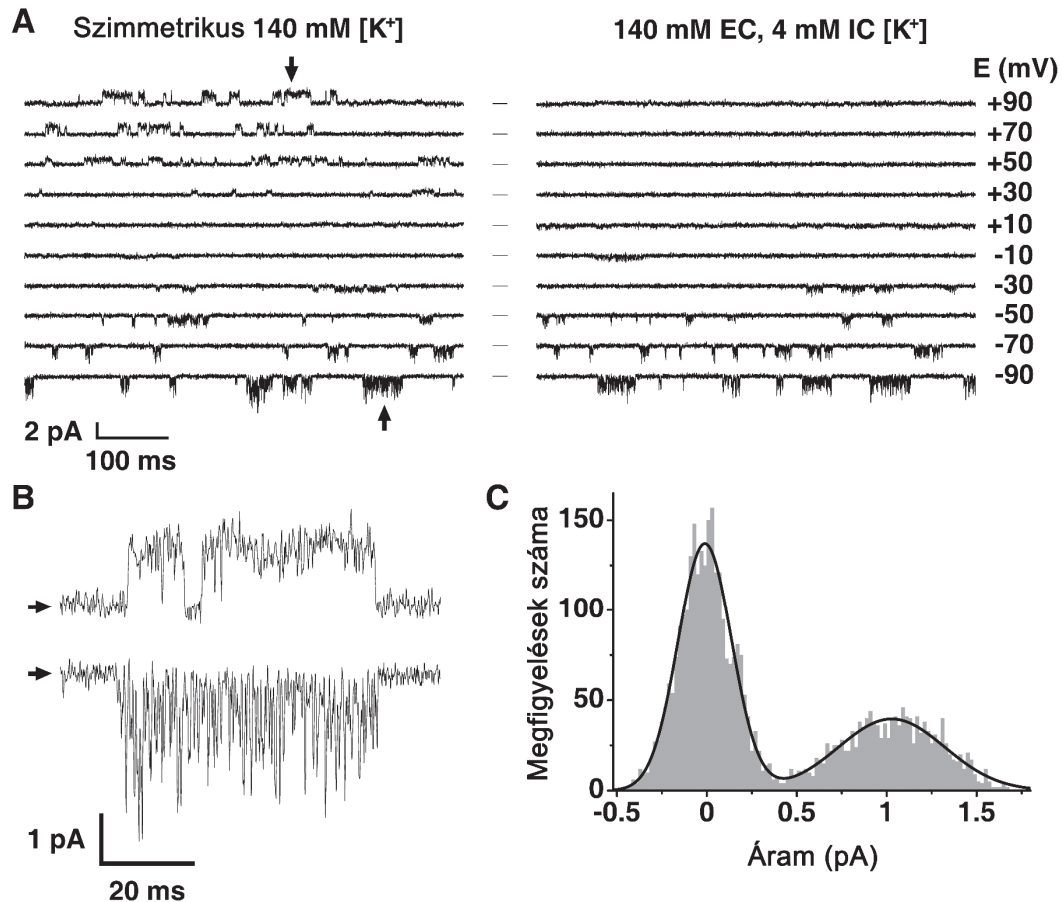


**22. ábra: A kalciummal telített EGTA mikroinjektálása aktiválja a TRESK csatornát, viszont az EGTA injektálása önmagában kivédi a receptor-mediált TRESK aktivációt.** Az egér TRESK csatornát kifejező petesejtek három csoportját mikroinjektáltam  $\text{Ca}^{2+}$ +EGTA+HEPES (50 mM mind, pH 7.3 (KOH)), EGTA+HEPES, vagy HEPES oldatokkal, két-elektrodos voltage clamp mérés közben ( $n=3 \times 4$ , "Injektálás"). A  $\text{K}^+$  áramokat a szokásos módon 80 mM EC  $[\text{K}^+]$ -ban mértem, -100 mV-os feszültséglépések végén, 5 percig az injektálást követően. Majd ezután az EGTA+HEPES és HEPES csoportokban a sejteket a koexpresszált  $\text{M}_1$  muszkarinos acetilkolin receptoron keresztül ingereltem 1  $\mu\text{M}$  karbachollal (ahogy ezt a *piros vonal* jelöli). Az áramokat a kiindulási értékükre normalizáltam és a három csoportra jellemző átlagokat ábrázoltam. A szürke sávok a szórást ( $\pm$  S.E.M.) jelölik. Az oldatokból 50 nl térfogatot injektáltam, ez becslés szerint kb. 10-szeresére hígul a citoplazmában. A HEPES puffer a pH stabilitást biztosította. Módosítva a [2] közleményből.

A  $\text{Ca}^{2+}$ +EGTA+HEPES oldat mikroinjektálása  $8.4 \pm 1.3$ -szorosára ( $n=4$ ) növelte a TRESK áramot 5 perc alatt, hasonlóan nagy mértékben, mint a receptor ingerlés. (Tízszeres hígulással számolva a kezdeti szabad  $[\text{Ca}^{2+}] \approx 30 \mu\text{M}$ . Ez  $10 \mu\text{M}$  alá esik, ha a teljes  $[\text{Ca}^{2+}]$  5-ről 4.9 mM-ra csökken.) Ha az injektált oldat nem tartalmazott  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, csak EGTA-t és HEPES-t, akkor az áram nem aktiválódott az injektálás után ( $1.2 \pm 0.1$ -szeres áram növekedés 5 perc alatt,  $n=4$ ), és a citoplazma  $[\text{Ca}^{2+}]$  alacsony szintre pufferelése az  $M_1$  receptor ingerlés TRESK aktiváló hatását is kivédte ( $1.2 \pm 0.1$ -szeres további növekedés). Az elmaradt receptor-függő aktiváció nem a mikroinjektálás nem specifikus hatása volt, mivel a csak HEPES pufferral injektált kontroll oocyták normálisan reagáltak a karchacholra ( $7.3 \pm 0.9$ -szeres TRESK áram növekedés a 0 perces értékhez képest,  $n=4$ , 22. ábra). Így tehát a TRESK aktiválódott a citoplazma  $[\text{Ca}^{2+}]$  emelkedésére a kalcium forrásától függetlenül, viszont a  $[\text{Ca}^{2+}]$  stabilizálása alacsony szinten kivédte a receptor-mediált csatorna aktivációt. Ebből következik, hogy a citoplazma  $[\text{Ca}^{2+}]$  növekedése a TRESK csatorna receptor-mediált aktivációjának szükséges és elégséges feltétele.

### 5.5 A kalcium hatása a TRESK csatornára közvetett

Megvizsgáltuk, hogy a kalcium ion közvetlenül a TRESK csatornafehérjéhez kötődve hozza létre az aktiváló hatást, vagy pedig közvetett úton hat. A TRESK aktiváció kinetikája jelentősen különbözött ugyanabban a petesejtben a kalcium-aktivált klorid áramétól (20.B ábra), ráadásul a TRESK csatorna aktivált állapota percekkel a receptor agonista elvonását követően is fennmaradt, amikor a kalcium jel már minden bizonnyal régen lecsengett (20.C ábra). Mindezek valószínűsítik, hogy az aktiváció közvetett úton jön létre. A kérdés egzakt megközelítésére a TRESK csatorna aktivitást sejtmentes rendszerben, belsejét kifordított (inside-out) kivágott membrán foltban, egyedi csatorna mérési körülmények között vizsgáltam úgy, hogy a membrán eredeti intracelluláris oldalához különböző  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú oldatokat adtam. Ennek kapcsán a TRESK néhány alapvető egyedi csatorna tulajdonságát elsőként határoztam meg (23. ábra) [2].



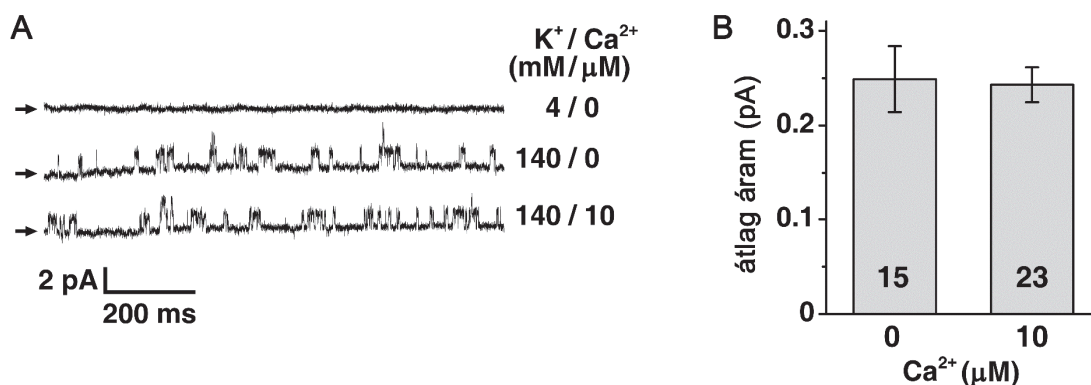
### 23. ábra: A TRESK egyedi csatorna működés alapszintű jellemzése

**A.** Reprezentatív egér TRESK megnyílások egy *Xenopus* petesejtéből kivágott, belsejét kifordított membrán foltban, különböző feszültségeken (ld. *jobb oldalon*) 140 mM szimmetrikus [K<sup>+</sup>]-ban (*bal panel*), vagy ugyanebben a foltban az IC [K<sup>+</sup>] 4 mM-ra csökkentése után (*jobb panel*). A nulla áram szinteket vízszintes vonalak jelölik középen. **B.** Az A panelen függőleges nyilakkal jelölt, +90 és -90 mV-on regisztrált megnyílásokat nagyítva mutatom. A TRESK szokatlan aszimmetrikus kapuzási viselkedést mutat szimmetrikus 140 mM [K<sup>+</sup>]-ban. A kifelé irányuló áram inkább négyyszögjelszerű, a befelé irányuló áram viszont nagyon rövid (<1-2 ms) megnyílások sorozatából áll. A nulla áramot vízszintes nyilak jelölik. **C.** Egy szimmetrikus 140 mM [K<sup>+</sup>]-ban +90 mV-on mért egyedi áram regisztrátumból készült reprezentatív hisztogramot két normális eloszlás függvény összegével illesztettem. A TRESK egyedi áram amplitúdót a csúcsok közötti távolság jelenti a vízszintes tengelyen. Négy membránfolt mérés átlagából meghatározva az egyedi csatorna vezetőképesség  $13 \pm 1$  pS nagyságúnak adódott. Módosítva a [2] közleményből.

A TRESK csatornát kifejező *Xenopus* oocyták membránjából kivágott inside-out membrán foltokban jellegzetes egyedi csatorna aktivitás jelentkezett, amely a kontroll petesejtekben nem volt megfigyelhető (23. ábra). Szimmetrikus 140 mM [K<sup>+</sup>]-ban az egyedi megnyílásoknak megfelelően befelé és kifelé irányuló áramok is felléptek a negatív és pozitív membránpotenciál értékeken

(23.A ábra, *bal* panel). Amikor viszont a hozzáférhető intracelluláris oldalon a  $K^+$  koncentrációt 4 mM-ra csökkentettem (a fiziológias megoszlás fordítottja), akkor a kifelé irányuló áramok eltűntek, ámde a befelé irányuló komponensek alig változtak, ami jól megfelel egy  $K^+$  szelektív háttér csatorna várt működésének (23.A ábra, *jobb* panel). Habár a TRESK csatorna egyedi áramai nagyon kicsik ( $\approx 1$  pA) és a mérőmódszerünk feloldási határára esnek, az eredményekből nyilvánvaló, hogy a TRESK a többi  $K_{2P}$  csatornára nem jellemző aszimmetrikus kapuzási tulajdonságot mutat (23.B ábra), melynek mechanizmusa jelenleg nem ismert. A TRESK egyedi csatorna vezetőképessége ( $13 \pm 1$  pS,  $n=4$ ) a többi  $K_{2P}$  csatornáétól eltérő nagyságú, ami a csatorna azonosítását izolált sejtekből kivágott membrán foltokban is lehetővé teszi [14].

A magas koncentrációjú ( $10 \mu\text{M}$ )  $\text{Ca}^{2+}$  teljes oocyta mérésekben többszörösére növelte a TRESK áramot (22. ábra), de nem befolyásolta az egyedi csatorna aktivitást három vizsgált inside-out kivágott membrán foltban (24. ábra). Ez az eredmény megerősíti azt a következtetést, hogy a TRESK csatornát nem a  $\text{Ca}^{2+}$  ion közvetlen csatornafehérjéhez kötődése aktiválja, hanem a szabályozásban egy közvetett citoplazma jelátviteli út közreműködik.

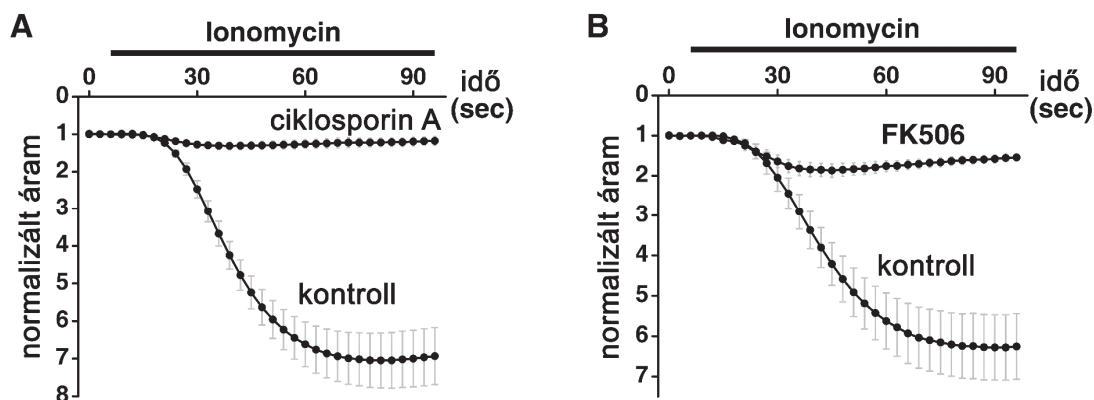


**24. ábra: A TRESK csatornát tartalmazó inside-out membrán foltokra ráfolyatott magas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú oldat nem változtatja az egyedi csatorna aktivitást**

**A.** Reprezentatív egér TRESK egyedi csatorna aktivitások láthatók egy inside-out membrán foltban különböző  $[K^+]$  és  $[Ca^{2+}]$  koncentrációjú oldatokban (ld. a panel *jobb* szélén). Négy másodpercenként egymásodperces időtartamú egyedi csatorna regisztrátumot készítettem +90 mV-on. A nulla áram szinteket *vízszintes nyilak* jelölik. A  $10 \mu\text{M}$  szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú kalcium pufferben nem különbözött a TRESK aktivitás a kalcium mentes, magas [EGTA] jelenlétében mérthez képest. **B.** Az átlagos áramok nagyságát olyan egymásodperces időtartamú egyedi csatorna regisztrátumokból számoltam, mint az A panelen látható. Az oszlopokban a számításhoz használt regisztrátumok száma látható a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes, illetve  $10 \mu\text{M}$  szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú oldatok esetén. Módosítva a [2] közleményből.

## 5.6 A kalcineurin hozza létre a kalcium-függő TRESK aktivációt

A TRESK kalcium-függő aktivációját kivédik a kalcium/kalmodulin-dependens protein foszfatáz kalcineurin gátlószerei, a ciklosporin A (CsA) és FK506 (tacrolimus) [2]. A CsA előkezelés (100 nM, 2–3.5 h) nem befolyásolta a TRESK alapáramot *Xenopus* petesejtekben ( $3.3 \pm 1.3 \mu\text{A}$  a CsA-előkezelt ( $n=5$ ) és  $2.6 \pm 0.7 \mu\text{A}$  a kontroll csoportban ( $n=7$ )). Azonban már ez az alacsony koncentrációjú CsA is gyakorlatilag teljesen kivédte az ionomycin TRESK aktiváló hatását ( $1.2 \pm 0.1$ -szeres aktiváció 1.5 perc alatt a CsA-val kezelt,  $6.9 \pm 0.6$ -szoros a kontroll csoportban, 25.A ábra)



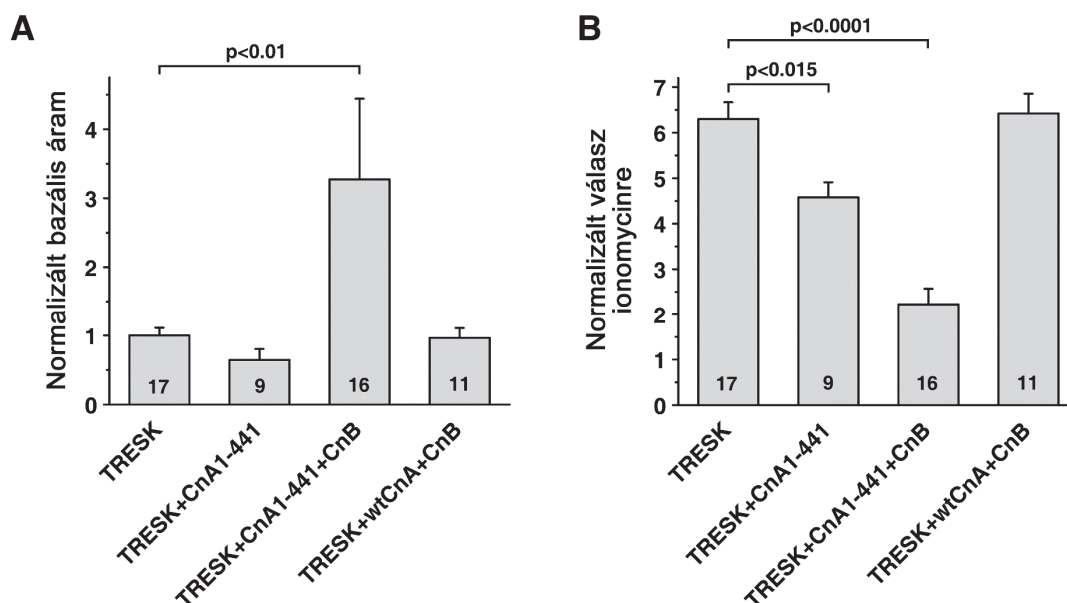
**25. ábra: A ciklosporin A és FK506 kalcineurin gátlószerek kivédik a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő TRESK aktivációt**

**A.** A ciklosporin A-val előkezelt (100 nM, 2–3.5 h,  $n=5$ ) és kontroll ( $n=7$ ) egér TRESK csatornát kifejező petesejteket ionomycinnel ( $0.5 \mu\text{M}$ ) stimuláltam 80 mM EC [ $\text{K}^+$ ]-ban. A TRESK áramokat -100 mV-on mértem, mint a 20. ábrán, normalizáltam az ingerlést megelőző áram értékre, és átlagoltam. A szürke vonalak a szórást ( $\pm$  S.E.M.) jelölik.  
**B.** Az A panelen bemutatott kísérletet megismételtem FK506 (200 nM, 2–3-h) előkezeléssel ciklosporin A helyett ( $n=5$  mindkét csoportban). Módosítva a [2] közleményből.

A kalcineurin szerepét a TRESK aktiváció folyamatában megerősítettük egy másik gátlószer, az FK506 felhasználásával, amely a ciklosporin A-tól eltérő hatásmechanizmussal gátolja a foszfatázt. Az FK506-tal előkezelt (200 nM, 2–3 h) petesejtekben a nyugalmi TRESK áram kisebb volt ( $1.7 \pm 0.6 \mu\text{A}$ ,  $n=5$ ), mint a kontroll sejtekben ( $6.3 \pm 2.6 \mu\text{A}$ ,  $n=5$ ), lehetséges, hogy ebben az oocita preparátumban a magasabb bazális kalcineurin aktivitást gátolta az FK506. Mindemellett az FK506 előkezelés megakadályozta az ionomycin TRESK aktiváló hatását ( $1.5 \pm 0.1$ -szeres aktiváció 1.5 perc alatt az FK506-tal

előkezelt csoportban, szemben a  $6.3 \pm 1.5$ -szeres növekedéssel a kontroll sejtekben,  $n=2 \times 5$ , 25.B ábra). A farmakológiai eredmények tehát egyértelműen mutatták, hogy a kalcineurin felelős a kalcium-függő TRESK szabályozásért [2].

A farmakológiai megközelítés mellett molekuláris biológiai módszerekkel is igazoltuk a kalcineurin meghatározó szerepét a TRESK szabályozásban. Prof. Gerald R. Crabtree laboratóriumából Isabella A. Graefftől elkértem a kalcineurin A és B alegység (CnA és CnB) cDNS-eket tartalmazó plazmidokat és a kódoló régióikat pXEN expressziós plazmidba szubklónoztam, illetve az A alegység C-terminális autoinhibitoros doménjének csonkolásával konstitutívan aktív foszfatazt állítottam elő (CnA1-441). Ha a TRESK csatornával a konstitutívan aktív CnA1-441 és CnB alegységeket koexpresszáltuk (háromszoros koexpresszió), akkor jóval nagyobb TRESK nyugalmi áramot kaptam, mint a csak TRESK csatornát kifejező petesejtekben (26.A ábra).



**26. ábra: A konstitutívan aktív kalcineurin koexpressziója megnöveli a TRESK bazális áramát és csökkenti a már eleve is aktív csatorna további (relatív) aktivációját ionomycin hatására**

**A.** Ugyanazon petepreparátum különböző csoportjaiban kifejeztük az oszlopok alatt jelölt fehérjéket (a + jelek koexpressziót jelentenek, *wtCnA*: vad típusú kalcineurin A, *CnA1-441*: konstitutívan aktív kalcineurin A, *CnB*: regulátoros kalcineurin B alegység). Az áramokat normalizáltam a kontroll, csak TRESK csatornát expresszáló csoport átlagára. **B.** Ugyanazokat sejteket, mint az A panelen, ionomycinnel ingereltem a 21.B ábrán ismertetett módon. Az ionomycin adása utáni aktivált áramokat normalizáltam az ionofór kezelést megelőző értékre. Az oszlopokban a mért oocyták száma látható. Az oszlopok fölött megadott p értékeket Mann-Whitney teszttel számítottam, Bonferroni korrekció nem történt. (A különbségek mindkét panelen szignifikánsak Kruskal-Wallis ANOVA-val.) Módosítva a [2] közleményből.

A konstitutívan aktív kalcineurin jelenlétében az ionomycin ( $0.5 \mu\text{M}$ ) nem aktiválta annyiszorosára a háttér  $\text{K}^+$  áramot, mint a csak TRESK-et kifejező kontroll csoportban (26.B ábra). A konstitutívan aktív kalcineurin már alaphelyzetben megnövelte a TRESK csatorna áramát, ezért az kevésbé volt tovább aktiválható kalcium jel hatására. A kalcineurin B alegység nélkülözhetetlen eleme a kalcineurin heterodimer komplexnek, ezzel jó összhangban a CnA1-441 önmagában nem aktiválta a bazális áramot és csak kis mértékben csökkentette az ionomycin hatását (26. ábra). Csak a kalcineurin konstitutívan aktív változata hozta létre a TRESK aktivációt nyugalmi körülmények között; ha a vad típusú kalcineurin A-t koexpresszáltuk a kalcineurin B-vel és a TRESK csatornával, akkor sem a bazális áram, sem az ionomycin hatására létrejövő aktiváció mértéke nem változott [2]. A vad típusú kalcineurin A kalcium iránti érzékenysége megtartott volt, ezért nyugalmi körülmények között nem működött, csak a kalcium jel hatására aktiválódott, mint a petesejt endogén kalcineurin enzime.

Farmakológiai és molekuláris biológiai eredményeink egymást erősítve bizonyítják, hogy a kalcium-függő TRESK csatorna aktiváció a kalcineurin foszfatáz hatására jön létre.

### 5.7 Alegységenként négy szerin lehet a kalcineurin célpontja

A kalcineurin szerepe a TRESK szabályozásában felveti a lehetőségét, hogy (mint legegyszerűbb mechanizmus) a foszfatáz magát a csatornát defoszforilálja és ezen keresztül változtatja meg a  $\text{K}^+$  áram nagyságát. Ha ez így van, akkor alanin-pásztázó mutagenézis módszerrel megbecsülhetők a foszfatáz célpontjai a TRESK szekvenciában. Ha a szabályozásban fontos, kalcineurin által defoszforilált szerint (vagy treonint) cserélünk alaninra, akkor a mutáns TRESK csatorna magas bazális aktivitása várható. Konstitutívan aktívvá teszi a mutáció a csatornát, hiszen az alanin nem tud foszforilálódni, vagyis nyugalmi körülmények között is a defoszforilált szerint utánozza, amely viszont a kalcineurinnal aktivált állapotnak felel meg. Sajnos azonban a mutáció hatására megnövekvő bazális  $\text{K}^+$  áram kimutatása bizonytalan és elméleti szempontból aggályos. A mutáció ugyanis a kalcium-függő szabályozási

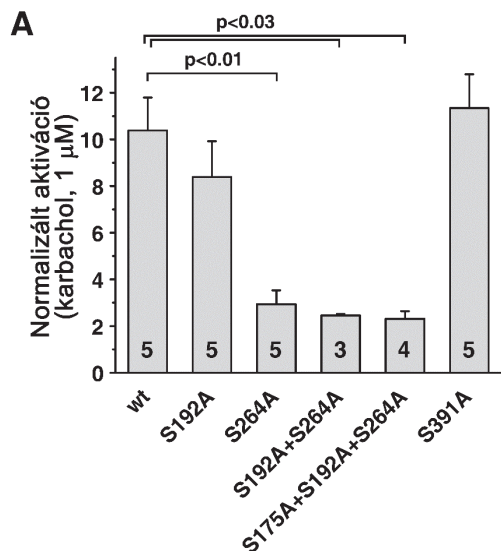
mechanizmustól függetlenül is befolyásolhatja a nyugalmi  $K^+$  áram nagyságát, legkézenfekvőbb módon például megváltoztathatja az expresszió mértékét és ezen keresztül a csatornák számát a plazmamembránban. Márpedig a standard teljes oocyta két-elektrodos feszültségzár mérés során nem lehet a csatorna szám és a bazális csatorna aktivitás változása között különbséget tenni.

Emiatt kiegészítettük az alanin mutánsok bazális áram mérését az ionomycinnel (vagy receptor ingerléssel) kiváltott aktivációjuk mértékének meghatározásával. Ha a keresett szabályozási ponton alanint tartalmazó mutáns bazális aktivitása fokozott, akkor az ilyen csatorna ionomycin hatására már csak kevésbé tud tovább aktiválódni, vagyis várható, hogy az ionomycinre adott relatív  $K^+$  áram növekedés kisebb lesz. Az ionomycin hatására létrejövő  $K^+$  áram növekedés meghatározása önkontrollos méréssel végezhető sejtenként, tehát technikai szempontból megbízhatóbb, mint a bazális áram, amely egy pete populáción belül is szórást mutat. Mindazonáltal az ionomycinre adott válasz mérése is rejt elméleti veszélyt magában. Ha az aktivációs mechanizmusban résztvevő szerkezeti elemekben található, de valójában nem foszforilálódó, aminosavat roncsolunk el a mutációval, akkor előfordulhat, hogy az ionomycinre adott válasz a vártan megfelelően csökken, egyaránt alacsony nyugalmi és ingerlés utáni csatorna aktivitások mellett.

Összefoglalva tehát, ha egy szerin vagy treonin alaninra cserélése megnöveli a bazális TRESK áramot és csökkenti az ionomycin hatására létrejövő relatív aktiváció mértékét, akkor az adott aminosav a kalcineurin valószínű szubsztátja. Illetve fordítva, ha a vizsgált szerin vagy treonin alaninra cserélése nem befolyásolja (a vad típusú csatornához képest) a bazális áramot és az ionomycinre adott választ, akkor az adott aminosav valószínűleg nem vesz részt a kalcium-függő szabályozásban.

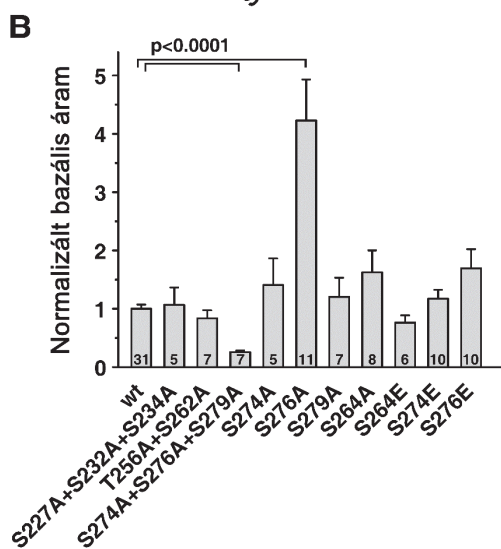
Kezdeti kísérleteinkben az internetes motívum kereső programok által jóslott foszforiláció-függő 14-3-3 adapter fehérje kötőhelyeket (S192 és S264 az egér csatornában) hoztuk gyanúba (ld. részletesen későbbi fejezetben), arra gondolva, hogy ezek valószínű célpontok, ha amúgy is foszforilálódnak. Emellett az egér csatorna C-terminálisában található 391-es szerint vizsgáltuk, mivel a TREK és TASK csatornák szabályozásáról tudtuk az irodalomból, hogy

abban a C-terminális kiemelt jelentőségű. Első lépésben a mutáns csatornák kalcium szignálra adott válaszát mértük, amelyet a koexpresszált M<sub>1</sub> muszkarinos acetilkolin receptor ingerlésével idéztünk elő (27. ábra, A panel).

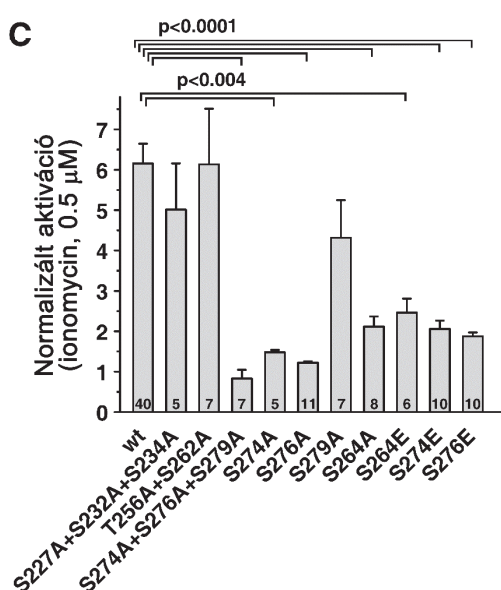


**27. ábra: A TRESK mutánsok bazális K<sup>+</sup> áramának és a kalcium jelre létrejövő aktivációjuk mértékének meghatározása**

**A.** A vad típusú (*wt*) egér TRESK csatornát vagy annak mutáns változatát (ld. az *oszlopok alatt*) kifejező *Xenopus* petesejtekben a koexpresszált M<sub>1</sub> muszkarinos acetilkolin receptort karybachollal (1 μM) ingereltem. Az ingerlés hatására megnövekedett áramot normalizáltam az ingerlés előtti értékre minden sejtben.



**B.** A bazális háttér K<sup>+</sup> áramot mértem, a vad típusú (*wt*) TRESK csatornát vagy annak mutáns változatát (ld. az *oszlopok alatt*) kifejező *Xenopus* petesejtekben. A mutáns TRESK csatornák áramát normalizáltam a vad típusú TRESK átlagára ugyanabban a pete preparátumban.



**C.** Ugyanazoknak a mutánsokat, mint a B panelen, ionomycinnel (0.5 μM) aktiváltam (a 21.B ábrán bemutatott módon) és az áramuk relatív aktivációját ábrázoltam (mint a 26.B ábrán). Pl. a vad típusú (*wt*) TRESK kb. 6-szorosára aktiválódott.

A mutációk közötti + jelek az oszlopok alatti feliratokban azt jelentik, hogy a vizsgált csatorna a megadott mutációkat egyaránt tartalmazta. Az oszlopokban a mért sejtek számát jelöltem. A diagramok fölött megadott p értékeket Mann-Whitney U teszttel számítottam, Bonferroni korrekció még nem történt. Módosítva a [2] közleményből.

Az S264A mutáció csökkentette a karbachol hatására létrejövő relatív áram növekedést (27.A ábra). Ezzel szemben a C-terminálisban található szerin S391A mutációja, illetve a másik feltételezett 14-3-3-kötőhely S192A mutáció nem befolyásolta a csatorna kalcium jelre adott válaszát. A tripla mutáns S175A/S192A/S264A csatorna kalcium-függő aktivációja nem különbözött szignifikánsan az S264A mutánsétól. Az S264A mutáns kalcium szignálra adott válasza szignifikánsan csökkent a vad típusú csatornához képest, azonban nem szűnt meg teljesen. Ez a csatorna még mindig közel háromszorosára aktiválódott (27.A ábra), ami arra utalt, hogy az S264-en kívül egy másik szerin talán még fontosabb lehet a kalcineurin-függő szabályozásban [2].

A következő kísérletekben szisztematikusan vizsgáltam az intracelluláris szerin és treonin aminosavakat, az adatok egy részét a 27. ábra B és C panel mutatja be. A regulációs pontok megtalálását gyorsította, hogy az egymáshoz közel található szerin és treonin aminosavakat együtt is alaninra lehetett cserélni *in vitro* irányított mutagenézis módszerrel, ami csökkentette a vizsgálandó mutánsok számát. Az S227A/S232A/S234A tripla és T256A/S262A dupla mutánsok bazális árama és kalcium-függő aktivációja megegyezett a vad típusú csatornáéval (27.B és C ábra), tehát az ezekben a mutánsokban lecserélt aminosavak valószínűleg nem vesznek részt a szabályozásban. Ezzel éles ellentétben viszont az S274A/S276A/S279A mutáns egyáltalán nem aktiválódott ionomycin hatására (27.C ábra). Mindazonáltal, szemben a várakozásokkal, e tripla mutáns bazális árama szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusú csatornáé (27.B ábra).

Kíváncsiak voltunk, hogy a tripla mutánsban módosított aminosavak közül melyik felelős a hatásért, ezért megvizsgáltuk az S274A, S276A és S279A mutáns TRESK csatornákat egyesével. Az S276A mutáns expressziója rendkívül nagy bazális áramot eredményezett (4.2-ször nagyobb, mint a vad típusú csatornáé, 27.B ábra), emellett csak alig (1.2-szeresre) aktiválódott ionomycin hatására (27.C ábra). Az S276A mutáns tehát mindkét elvárt tulajdonsággal rendelkezik, ezért valószínűleg a szerin 276 aminosav a kalcineurin fő funkcionális szempontból meghatározó célpontja a TRESK csatornában. Az S274A mutáció szintén nagyon alacsony szintre csökkentette

az ionomycin általi aktivációt, azonban ennek a mutánsnak a bazális árama nem különbözött szignifikánsan a vad típusú csatornáétól. Ennek megfelelően az S274 is részt vehet a foszforilációs szabályozásban, de az is elképzelhető, hogy a mutációja más módon interferál a szabályozási mechanizmussal. Az S279A mutáció nem változtatta a bazális áramot. Habár ez a mutáns átlagában kisebb aktivációt mutatott ionomycin adásakor, a különbség a vad típusú csatornához képest nem volt statisztikailag szignifikáns. Ezért az S279 hozzájárulása a kalcium-függő TRESK szabályozáshoz kisebb mértékűnek tűnik, mint az S274 és S276 aminosavaké.

A szabályozásban kiemelt fontosságú aminosavak, az egér TRESK csatornában S274, S276 és S279, egymáshoz közel találhatók (az RLSCSILSN szekvencia részeként), ezért az egyes aminosavak elkülönített szerepének vizsgálata nehézségekbe ütközik. Az egyes szerinek mutációi befolyásolhatják a szomszédos pozíciókban a foszforilációs és defoszforilációs folyamatokat. Emiatt erre a három szabályozásban fontos szerinre a továbbiakban gyakran mint funkcionális egységre, a "szerin klaszter" néven hivatkozom. A szerin klaszter konzervált a humán TRESK csatornában is, az S262, S264, S267 aminosavak formájában (az RLSYSILSN szekvencia részeként) és ezek mutációja hasonlóan módosítja a csatorna kalcium-függő szabályozását, mint az egér ortológét (az adatokat nem mutatom).

A kalcineurin-dependens TRESK szabályozásban fontos szerin klaszter az intracelluláris hurok régió harmadik transzmembrán szegmenshez közeli részén helyezkedik el (2. ábra). Azt mondhatjuk, hogy ez szokatlan lokalizáció egy  $K_{2P}$  csatorna alegység szabályozó régió számára, hiszen mai ismereteink szerint a TREK és TASK csatornák esetén az összes leírt szabályozó mechanizmus a csatornák negyedik transzmembrán szegmens utáni intracelluláris C-terminális részén konvergál (9. és 10. ábra). Ezzel kapcsolatban azonban meg kell említenünk e helyen, hogy a TRESK az egyéb  $K_{2P}$  csatornáktól lényegesen eltérő szerkezeti arányokkal rendelkezik. Habár követi a 4TMS/2P transzmembrán topológiát (2. ábra), a második és harmadik transzmembrán szegmens közötti intracelluláris hurok régiója különösen hosszú, mintegy 130 aminosav. Ez a többi  $K_{2P}$  csatornában sokkal rövidebb

(20-40 aminosav körüli). A TRESK intracelluláris C-terminális régiója viszont feltűnően rövid, kb. 25 aminosav, eltérően az egyéb  $K_{2P}$  csatornáktól, amelyekben a C-terminális jellemzően jóval hosszabb (14 csatorna átlagában 117 aminosav, legrövidebb a humán TALK-1 csatornában kb. 36 aminosavval, leghosszabb az egér TASK-2 csatornában kb. 252 aminosavval). Mindezek ismeretében érthető, hogy a  $K_{2P}$  csatornák körében kivételesen hosszúnak számító TRESK intracelluláris hurok régió csatornaműködést szabályozó elemeket tartalmaz.

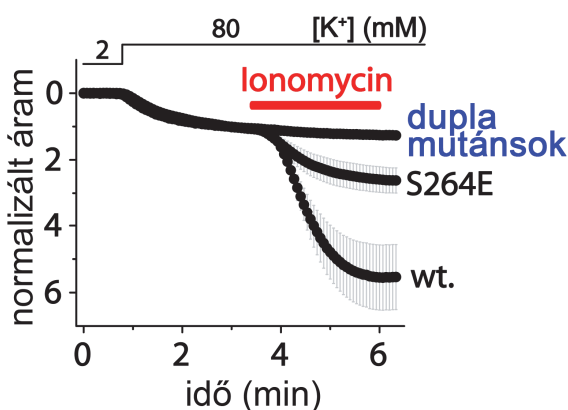
Az egér TRESK S264A mutáns csökkent válaszkészségét a kalcium szignálra, a receptor ingerlésen kívül (27.A ábra), megerősítettük ionomycin alkalmazásával is (27.C ábra). Ebből következik, hogy az S264 aminosav is részt vesz valamilyen módon a kalcineurin-függő szabályozási mechanizmusban. Kézenfekvő lehetőség, hogy ezt az aminosavat is defoszforilálja a kalcineurin. Mindenesetre a következtetéssel kapcsolatban óvatosságra int, hogy az S264A mutáns bazális árama nem növekedett statisztikailag szignifikáns mértékben a vad típusú TRESK csatornáéhoz képest (27.B ábra). Nehéz azonban ezt az eredményt értelmezni, hiszen a mutáció egyben megakadályozza a 14-3-3 adapter fehérje kötődését is a csatornához és ennek összetett következményei lehetnek (ld. a későbbi fejezetekben). Összefoglalva tehát, a szerin klaszter három aminosava mellett, az egér TRESK csatornában az S264 (humán csatornában S252, mindkét fajban az RSNSCP szekvencia része) potenciális célpontja még a kalcineurin foszfatáznak [2,6].

A defoszforilált szerint utánzó alanin cserék mellett vizsgáltunk olyan mutánsokat is, amelyekben a foszfoszerineket glutamáttal helyettesítettük. A szabályozási pontokon nem defoszforilálható, negatív töltést tartalmazó mutáns csatornákról az várható, hogy azok a gátolt állapotban megrekednek, vagyis a bazális áramuk normális vagy kicsi és a kalcium jelre ezek is kevésbé reagálnak, mint a vad típusú csatorna. Ezzel az elképzeléssel jó összhangban az S264E, S274E és S276E mutáns csatornák bazális árama nem különbözött szignifikánsan a vad típusú TRESK-étől (27.B ábra). Ez különösen az S276E mutáns esetében figyelemreméltó, hiszen az ennek megfelelő alanin mutáns

S276A nagy bazális áramot eredményezett. Mindemellett, a vártnak megfelelően, mindegyik vizsgált glutamát helyettesítéses mutáns szignifikánsan kevésbé aktiválódott ionomycinre, mint a vad típusú csatorna (27.C ábra) [2].

Az S276A mutáció egymagában lényegében megszüntette a kalcium-függő szabályozást, viszont az S276E mutáns még kb. kétszeresére aktiválódott (27.C ábra). A fő szabályozási pont gátló, foszforilációt utánzó, állapotban rögzítése nagyobb teret engedhetett az egyéb szabályozó szerinek defoszforiláció általi aktiváló hatásának, mint a fő szabályozó pont aktivált állapotban rögzítése az alanin cserével. Az S276E mutánshoz hasonlóan az S264E, S274E és S279A mutációk is biztosan lehetetlenné tették a lecserélt szerinek megfelelő szabályozási pontok foszforilációját, de egyben jelenlétükben még fennmaradt jól mérhető kalcium-függő aktiváció (27.C ábra). Felmerült emiatt a kérdés, hogy a kalcineurin-dependens szabályozásban szereplő négy azonosított szerin fenti mutációinak kombinációjával teljesen kivédhető-e a kalcium-függő TRESK aktiváció.

A kérdés megválaszolására az S264E és a szerin klaszter különböző mutációt kombináltuk egymással. Az S264E/S274E, S264E/S276E és S264E/S279A mutációk egyaránt kivédtek a kalcium-függő TRESK aktivációt (28. ábra) [6]. Mindhárom dupla mutáns szignifikánsan kevésbé aktiválódott, mint az S264E egyszerezesen mutáns alegységből felépülő csatorna ( $p < 0.01$ , ANOVA, Scheffe teszt).



**28. ábra: Az S264 és a szerin klaszter együttes mutációi megszüntetik a kalcium-függő TRESK szabályozást**

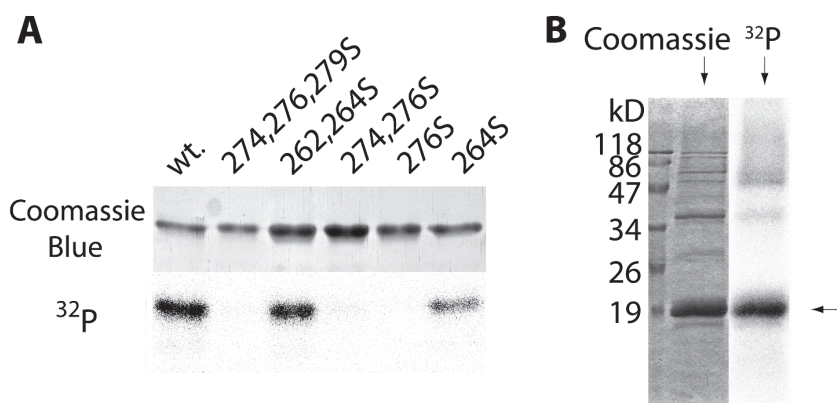
A *Xenopus* petesejtekben kifejezett vad típusú (wt.,  $n=15$ ), S264E ( $n=10$ ), S264E/S274E ( $n=9$ ), S264E/S276E ( $n=7$ ) és S264E/S279A ( $n=6$ ) mutáns (egér) TRESK csatornák  $K^+$  áramát  $-100$  mV-on mértem két-elektrodos feszültségzár módszerrel. Az EC  $[K^+]$ -t 2-ről 80 mM-ra növeltem, majd ionomycint ( $0.5 \mu M$ , *piros vonal*) adtam. Az S264E/S274E, S264E/S276E és S264E/S279A mutáns

csatornák (kék "dupla mutánsok") nem aktiválódtak ionomycin hatására és a görbéik egymáson futnak a grafikonon. Ebben a kísérletben minden csatorna konstrukcióval koexpresszáltuk a domináns negatív 14-3-3 $\gamma$  fehérjét, hogy elősegítsük a szerin klaszter foszforilációját (ld. a későbbi fejezetekben). Módosítva a [6] közleményből.

Az S264E mutációval együtt a szerin klaszter bármelyik szerinjének helyettesítése lényegében teljesen kivédte a kalcium-függő TRESK aktivációt. Ez valószínűsíti, hogy a klaszter funkcionális egységként működik, amelyben az egyik szerin mutációja befolyásolja a többi szerin szabályozó működését is.

A mutációs analízis kijelölte a TRESK csatorna aktivitás szabályozásában fontos kalcineurin célpont szerineket. Szerettünk volna megbizonyosodni róla, hogy ezek a szerinek tényleg foszforilálódnak. Erre a legegyszerűbb kezdeti megközelítésünk az volt, hogy előállítottuk a TRESK intracelluláris hurok régiót *E. coli* baktériumokban fúziós fehérje konstrukciók formájában és ezeket különböző szövetekből készített citoszollal foszforiláltattuk [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP jelenlétében. Hogy a megközelítést specifikussá tegyük, a TRESK hurok régió minden olyan szerin és treonin aminosavát alaninra cseréltük (ismételt *in vitro* mutagenézis lépésekkel), amelyet nem kívántunk vizsgálni, illetve His<sub>8</sub> fúziós konstrukciókat használtunk, amelyekben az oktahisztidin címkét nem foszforilálhatták a citoszolban található kinázok.

*Xenopus* ovárium lebenyt homogenizáltunk és centrifugálással citoszol frakciót preparáltunk (ld. *Módszerek* 4.9 fejezet). Ezzel foszforiláltattuk a Ni-NTA rezinen immobilizált TRESKloop-His<sub>8</sub> konstrukciókat (ezek az egér TRESK 185-292 aminosavakat tartalmazzák, 29.A ábra) [5].



**29. ábra: A TRESK szabályozásban szerepet játszó szerinek *in vitro* foszforilációja citoszollal. A.** TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérjéket *Xenopus* oocyta citoszollal foszforiláltattunk [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP jelenlétében. A mutáns fehérjék csak a sávok felett jelölt szerineket tartalmazzák. (A "wt." konstrukcióban a 10 szerin és egy treonin megtartott volt.) A felső panel mutatja a Coomassie kékkel festett SDS-PAGE gél, az alsó pedig ugyanennek az autoradiogramját. **B.** Hasonló kísérlet egér agyból készített, gélfiltrált citoszollal. A mutáns TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérje csak az S274, S276 és S279 szerineket tartalmazta. Bal oldalon látható a Coomassie kékkel festett SDS-PAGE gél, jobb oldalon pedig az autoradiogramja. Módosítva az [5,6] közleményekből.

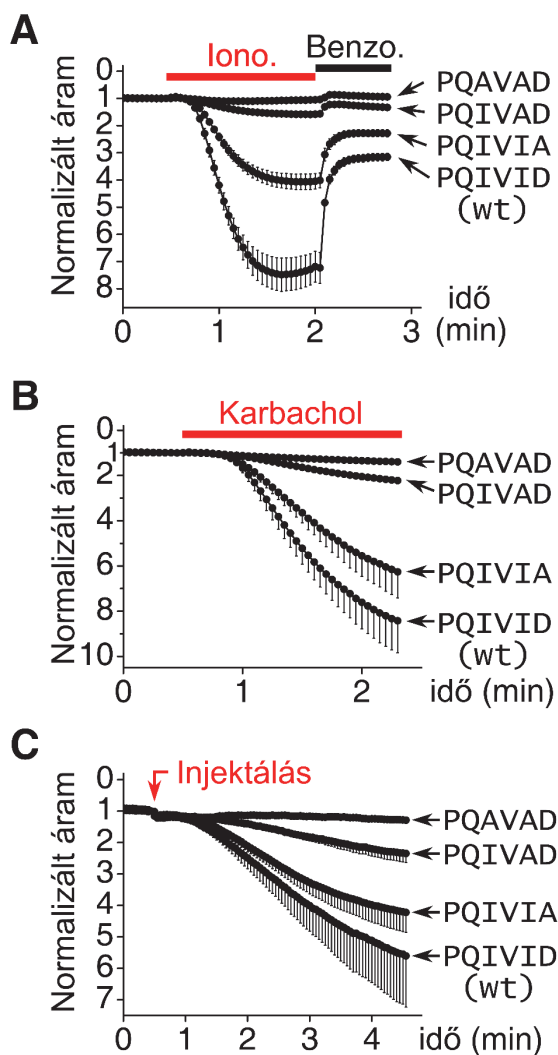
*Xenopus* ovárium (lényegében oocyta) citoszollal foszforilálódott a "wt." konstrukció, amely az egér TRESK hurok régió 185-292 fragmensére jellemző összes szerint és treonint tartalmazta (29.A ábra). Azonban a foszforiláció kimutatásához aránylag nagy radioaktivitásra volt szükség (1 MBq/sáv [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP). Foszforilálódott emellett az a konstrukció, amelyben csak az RSNSCP motívum S262 és S264 szerinje volt megtartott, illetve az is, amelyben csak az S264 maradt meg. Ez alapján tehát úgy tűnt, hogy a TRESK csatornában az S264 tényleg foszforilálódhat. Nem foszforilálódtak ilyen körülmények között viszont azok a TRESKloop-His<sub>8</sub> konstrukciók, amelyek csak a szerin klaszter S274, S276 és S279 szerinjeit tartalmzták (29.A ábra) [5].

Tekintetbe véve, hogy a TRESK kalcium-függő aktivációja után a K<sup>+</sup> áram visszatérése a nyugalmi állapotba milyen lassú a petesejt mérésben (20.C ábra), arra gondoltam, hogy az oocyta citoszolban csekély mennyiségben lehet jelen a szerin klasztert foszforiláló kináz. Valószínűleg emellett az is problémát okozott, hogy az oocyta citoszol készítési eljárás során a sejtekből származó ATP a preparátumban maradt, lerontotta a hozzáadott [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP specifikus aktivitását és ezzel csökkentette a  $^{32}\text{P}$  beépülést a fúziós fehérjébe. Ezért egér agyból készítettem citoszol frakciót úgy, hogy a kis molekulájú anyagokat eltávolítottam a fehérje preparátumból géliszűrőssel Sephadex G-25 oszlopon (ld. *Módszerek 4.9 fejezet*). Ez a citoszol preparátum, 20  $\mu\text{M}$  hideg ATP hozzáadását követően, 50 kBq [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP jelenlétében is jól kimutatható módon foszforilálta a csak S274, S276 és S279 szerineket tartalmazó TRESKloop-His<sub>8</sub> konstrukciót (29.B ábra) [6]. Az eredmény azt mutatja, hogy megfelelő körülmények között a szerin klaszter aminosavai is foszforilálódnak.

## 5.8 A kalcineurin kötődik a TRESK PxIxIT-szerű motívumához

A kalcineurin talán legismertebb szubsztrátja az NFAT (Nuclear Efactor of Activated T cells) transzkripció faktor. A kalcium jel hatására az NFAT-t a kalcineurin defoszforilálja, emiatt az a sejtmagba transzlokálódik és a T lymphocita aktivációban szereplő gének átíródását fokozza [270]. Ennek a mechanizmusnak a gátlásával hatnak a szervátültetés után gyakran alkalmazott

kalcineurint gátló immunszuppresszív gyógyszerek (pl. az értekezésben bemutatott kísérletekben is használt ciklosporin A és tacrolimus (FK506), 25. ábra). A kalcineurin irodalmának olvasása közben figyeltem fel arra [271], hogy az NFAT-ban leírt kalcineurin-kötő PxlIT konszenzus motívum hasonlít az egér TRESK hurokban található PQIVID szekvenciához. Az egyezés nem teljes, hiszen az utolsó aminosav eltér a konszenzus motívumtól, de ennek ellenére próbálkozásként megterveztem a PQIVID szekvencia néhány alanin mutációját, vajon hatással van-e ez a kalcium-függő csatorna szabályozásra. Mivel a prolin gyűrűs aminosav konformációs merevséget kölcsönöz a polipeptidláncnak, mutációja gyakran alapvetően megváltoztatja a fehérjék térszerkezetét. Emiatt a prolint nem módosítottam, hanem kicseréltem az egyik vagy mindkét izoleucint (PQIVAD és PQAIVAD mutánsok), illetve vizsgáltam az utolsó aszpartát aminosav szerepét a motívumban (PQIVIA mutáns) (30. ábra).



**30. ábra: A PQIVID motívum mutációi csökkentik az egér TRESK csatorna kalcium-függő aktivációját**

**A.** A vad típusú (PQIVID, wt) és a PQIVIA, PQIVAD vagy PQAIVAD mutáns TRESK csatornát kifejező *Xenopus* petesejteket ionomycinnel (Iono., 0.5  $\mu$ M, *pirossal jelölve*) ingereltem, majd benzocaint adtam (Benzo., 1 mM). Az áramokat a kiindulási (0 min) értékükre normalizáltam. A mutáns konstrukciók ionomycinre és benzocainra adott válasza szignifikánsan különbözött a vad típusú csatornáétól ( $n=5-6$  minden csoportban,  $p<0.001$ ).

**B.** Ugyanezeket a csatorna konstrukciókat és az  $M_1$  muszkarinos receptort koexpresszáló petesejteket karbachollal ingereltem (*pirossal jelölve*). A PQIVAD és PQAIVAD mutánsok kisebb mértékben aktiválódtak, mint a vad típusú csatorna ( $n=5$  minden csoportban,  $p<0.01$ ).

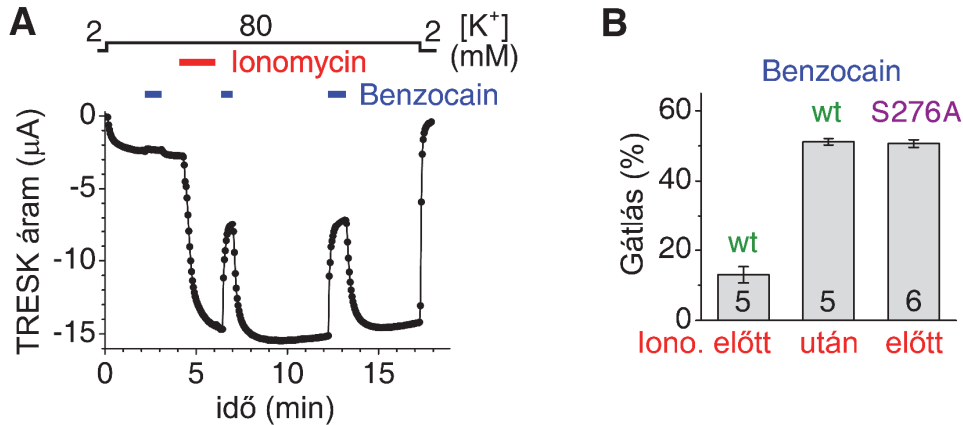
**C.** Ugyanezeket a TRESK konstrukciókat kifejező oocytákat mérés közben mikroinjektáltam telített kalcium pufferrel (mint a 22. ábrán, *pirossal jelölve*). A PQAIVAD mutáns aktivációja szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusú csatornáé ( $n=5$  minden csoportban,  $p<0.05$ ). Mindhárom kísérletet ANOVA-val, majd Scheffe teszttel értékeltem. Módosítva a [4] közleményből.

Mindegyik mutáns funkcionálisan kifejeződött *Xenopus* petesejtben, azonban a kalcium-függő aktivációjuk jelentősen különbözött a vad típusú TRESK csatornáétól. Mindkét izoleucin mutációja (PQAVAD mutáns) megszüntette a csatorna aktivációt, a citoplazma kalcium szint növelésének módjától függetlenül. Állandó maradt a PQAVAD mutáns háttér  $K^+$  árama akár  $Ca^{2+}$ -ionofórral, akár  $G_q$ -kapcsolt receptor ingerléssel vagy telített kalcium puffer mikroinjektálásával próbáltam kiváltani a szabályozást (30. ábra) [4]. A két hidrofób izoleucin oldallánc eltávolítása megakadályozta a kalcineurin kötődését a motívumhoz és a kísérletből az is kiderült, hogy ennek a fehérje interakciónak a kialakulása elengedhetetlenül szükséges az egér TRESK csatorna aktivációjához.

Már egy izoleucin alaninra cserélése is (PQIVAD mutáns) drámai mértékben csökkentette a kalcium-függő szabályozást. PI. ionomycin ( $0.5 \mu M$ ) hatására a PQIVAD mutáns árama csak  $1.6 \pm 0.1$ -szeresre növekedett ( $n=5$ ), szemben a vad típusú csatorna  $7.5 \pm 0.6$ -szoros aktivációjával ( $n=6$ ) ugyanabban a sejtpreparátumban (30.A ábra). Tehát az egyik izoleucin mutációja is számottevő mértékben csökkentette a motívum kalcineurin iránti affinitását és ezáltal a foszfatáz kötődését a csatornához. Az NFAT PxlIT konszenzus motívumtól eltérő aszpartát (D) is hozzájárul a TRESK csatorna kalcineurin kötéséhez, mivel az alaninra cserélése szintén csökkentette a csatorna aktivációt, a PQIVIA mutáns árama ionomycin hatására mérsékelten,  $4.1 \pm 0.3$ -szorosra növekedett ( $n=5$ ).

A PQAVAD (30.A ábra) és az S276A mutáns (27.C ábra) TRESK csatornákra egyaránt jellemző, hogy nem aktiválódnak ionomycin hatására. Az ionomycinre adott válaszuk alapján tehát a kétféle áram nem különíthető el, annak ellenére, hogy nagyon eltérő állapotú csatornákról van szó. A PQAVAD mutáns gátolt csatornának felel meg, amely nem aktiválható (mivel a kalcineurin nem tud hozzá kötődni), az S276A mutáns viszont konstitutívan aktív és ezért nem aktiválható (már tovább). Módszert dolgoztam ki a kétféle (gátolt, illetve aktivált TRESK csatornának megfelelő) áram megkülönböztetésére. A lokális anesztetikum benzocain a vad típusú TRESK csatorna állapotfüggő gátlását hozza létre [4]. A benzocain ( $1 \text{ mM}$ ) a nyugalmi TRESK áramot csak kevésbé

( $13 \pm 2$  %), viszont a kalcineurin-dependens úton aktivált, defoszforilált csatornák áramát jóval nagyobb mértékben gátolja ( $51 \pm 1$  %,  $n=5$ ,  $p<0.001$ , Student t-teszt, 31. ábra, [4]).



**31. ábra: A benzocaine az egér TRESK csatorna állapotfüggő gátlószere. A bazális TRESK áramot kevésbé gátolja, mint a kalcineurin által aktivált áramot.**

**A.** Az egér TRESK áramokat a 21.B ábrán ismertetett módon mértem, ionomycin (0.5 μM, *piros*) adása előtt és után. Az áramot időnként átmenetileg benzocainnal (1 mM, *kék*) gátoltam. A nyugalmi TRESK K<sup>+</sup> áram arányában sokkal kevésbé gátlódott, mint az ionomycin utáni aktivált áram. **B.** A vad típusú TRESK (*wt*, *zöld*) K<sup>+</sup> áramának gátlása benzocaine hatására ionomycin adása előtt és után (ahogy az oszlopdiagram alatt jelöltem *pirossal*), illetve az S276A (*lila*) konstitutívan aktív mutáns bazális áramának benzocaine érzékenysége azonos körülmények között. Az oszlopokban a mért sejtek számát tüntettem fel. Módosítva a [4] közleményből.

A benzocaine iránti érzékenység meghatározásával tehát elkülöníthető a vad típusú csatorna nyugalmi és a kalcium-függő aktiváció utáni árama. Ugyan nem értjük, hogy milyen mechanizmus felelős a benzocaine által létrehozott állapotfüggő TRESK gátlásért, de megkíséreltem ezt a farmakológiai eszközt a mutáns csatornák áramának vizsgálatára használni. A konstitutívan aktív S276A mutáns bazális áramát a benzocaine pontosan olyan mértékben gátolja ( $51 \pm 1$  %,  $n=6$ ), mint a vad típusú csatorna áramát a kalcium-függő aktivációt követően (31.B ábra, [4]). Ez megerősíti a korábbi következtetésünket arról, hogy az S276A mutáns tényleg megfelel a kalcineurin által defoszforilált, aktivált csatornának (ld. az 5.7 fejezetben). Az S264A mutáns bazális K<sup>+</sup> áramának gátlása benzocaine (1 mM) hatására ( $22 \pm 1$  %,  $n=8$ ) szintén meghaladja a vad típusú TRESK csatorna nyugalmi áramának gátlását ( $10 \pm 1$  %,  $n=14$ ,  $p<10^{-5}$ , Student t-teszt) ugyanabban a sejtpreparátumban [6], azonban kisebb mértékben tér el tőle, mint az S276A mutáns. Ezek a

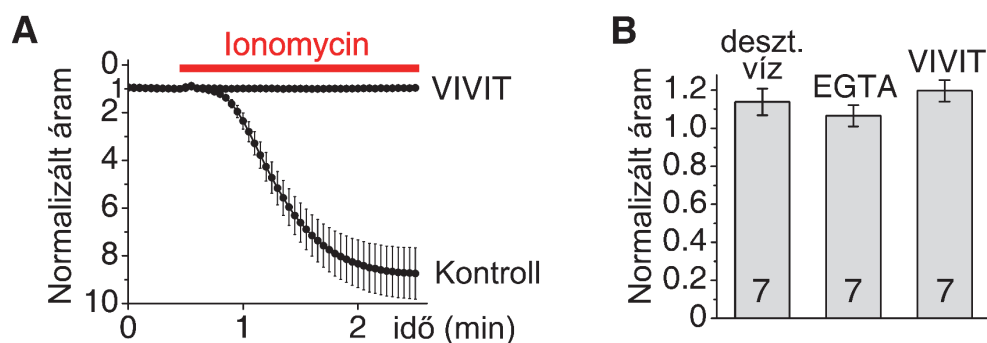
farmakológiai eredmények jó összhangban vannak azzal a következtetéssel, hogy az S276 szabályozási pont alapvető meghatározója a TRESK csatorna aktivitásnak, azonban emellett az S264 helynek is van járulékos szabályozó szerepe.

A PQIVID motívum mutációknál az ionomycin adása utáni benzocain érzékenység a csökkent áram aktivációnak megfelelően változott (30.A ábra). Amíg a vad típusú csatorna (PQIVID) ionomycin utáni árama  $57 \pm 2$  %-kal gátlódott 1 mM benzocain hatására ( $n=5$ ), addig a PQIVIA mutáns mérsékeltebb gátlódást mutatott ( $44 \pm 1$  %,  $n=5$ ), a PQIVAD mutáns gátlása kifejezetten csökkent ( $23 \pm 1$  %,  $n=5$ ), a PQAVAD mutáns ionomycin utáni benzocain érzékenysége ( $18 \pm 1$  %,  $n=5$ ) pedig megközelítette a vad típusú csatorna bazális áramára jellemző értéket (30.A ábra) [4]. A kalcineurin-kötő motívum egyre károsítóbb mutációinál tehát az ionomycin hatás csökkenésével a benzocain általi gátlás is együtt csökkent. Ez arra utal, hogy minél jobban akadályozott a TRESK interakciója a kalcineurinnal, a mutáns csatornáknak annál nagyobb hányada marad a nyugalmi gátolt állapotban a kalcium szignált követően és ezeket a foszforilált csatornákat a benzocain kevésbé gátolja.

Az alanin szubsztitúciós kísérletek egyértelműen a PQIVID motívum funkcionális jelentősége mellett szóltak. Szerettem volna ezt az eredményt megerősíteni a vad típusú csatorna felhasználásával is. Ehhez VIVIT peptidet mikroinjektáltam, amelynek MAGPHPVIVITGPHEE szekvenciáját arra optimalizálták, hogy nagy affinitással kötődjön a kalcineurin NFAT-kötő helyéhez [272]. A VIVIT peptid mikroinjektálása teljesen kivédte az egér TRESK kalcium-függő aktivációját (32.A ábra, [4]). A VIVIT peptid telítette a kalcineurin fehérje komplexnek azt a kötőhelyét, amelyen keresztül a TRESK csatorna hurok régió PQIVID motívumához kihorgonyzódik. A kalcineurin nem tudott interakcióba lépni a TRESK csatornával, ezért a defoszforiláció és  $K^+$  áram növekedés elmaradt. A VIVIT peptid erőteljes hatása a PQIVID mutációktól függetlenül igazolta, hogy a TRESK kalcineurin-kötő motívuma meghatározó szerepet játszik a csatorna szabályozásban.

Tekintve a kalcineurin TRESK aktivációban betöltött nélkülözhetetlen szerepét, időről időre újra felmerült a kérdés, hogy a csatorna *Xenopus*

petesejtekben mérhető bazális aktivitását is a foszfatáz alakítja-e ki. Korábban láttuk, hogy a kalcineurin gátlószer ciklosporin A az egyik petepreparátumban nem befolyásolta a TRESK bazális aktivitást, amíg egy másik preparátumban az FK506 gátolta azt (ld. az 5.6 fejezetet). Ezért lehetséges, hogy petepreparátumonként eltérő a kalcineurin hozzájárulása a bazális aktivitáshoz. Az olyan petesejtekben, amelyeknek nyugalmi  $[Ca^{2+}]$  koncentrációja magasabb a szokásosnál (pl. a nagymértékű háttér  $K^+$  csatorna expresszió toxikus hatása jobban érvényesül és végül akár a sejt pusztulásához is vezethet), a kalcineurin esetleg defoszforilálhatja a csatornák egy hányadát már nyugalmi körülmények között is. Hogy még egyszer megvizsgáljam ezt a kérdést a korábbiaktól független módszerrel, egy újabb petepreparátumban, megmértem az EGTA kalcium kelátor és a VIVIT peptid mikroinjektálás hatását a TRESK bazális áramra (32.B ábra, [4]).



### 32. ábra: A VIVIT peptid mikroinjektálása kivédi a kalcium-függő TRESK aktivációt, de nem befolyásolja a TRESK bazális áramát

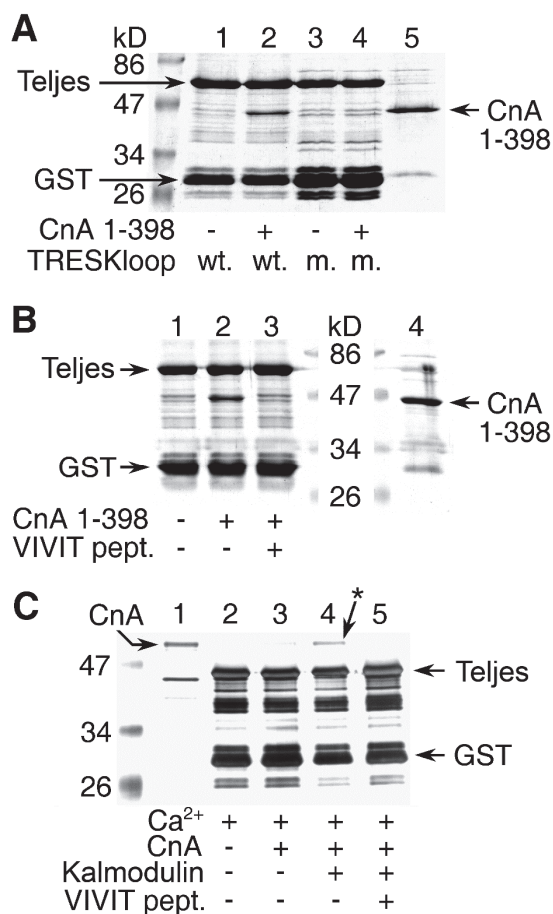
**A.** A vad típusú (egér) TRESK csatornát kifejező oocyták egyik csoportját VIVIT peptiddel (VIVIT, 10 mM, 50 nl, n=5), a másik csoport sejtjeit pedig desztillált vízzel mikroinjektáltam (Kontroll, 50 nl, n=5). A petesejteket ionomycinnel (0.5  $\mu$ M, *piros*) ingereltem 23-104 perccel a mikroinjektálás után. A  $K^+$  áramokat normalizáltam a kiindulási nyugalmi értékükre. A TRESK áram aktivációja szignifikánsan különbözött a két csoportban a mérés végén ( $p < 10^{-4}$ , kétmintás Student t-teszt). **B.** Az vad típusú (egér) TRESK csatornát kifejező petesejteket mikroinjektáltam 50 nl desztillált vízzel (*deszt. víz*), vagy magas koncentrációjú kalcium kelátorral (EGTA: 50 mM EGTA + 50 mM HEPES (pH 7.3, KOH), mint a 22. ábrán), vagy VIVIT peptiddel (VIVIT, 10mM). A TRESK áramot minden sejtben megmértem az injektálás előtt (-100 mV-on, 2/80 mM EC  $[K^+]$  változtatással), majd 54-110 perccel az injektálás után újra megmértem a  $K^+$  áramot ugyanígy (tehát minden sejtet kétszer mértem). Az injektálás után mért áramot normalizáltam ugyanannak a sejtnek az injektálás előtti értékére és minden csoportban hét sejt normalizált áramának átlagát ábrázoltam oszlopdiagram formájában. Az EGTA és VIVIT peptid mikroinjektálás hatása nem különbözött szignifikánsan a desztillált víz injektálásától (ANOVA). Az oszlopokban a mért sejtek számát tüntettem fel. Módosítva a [4] közleményből.

Tudjuk, hogy a citoplazma nyugalmi  $[Ca^{2+}]$  szubfiziológiás szintre csökkentése magas koncentrációjú EGTA mikroinjektálásával (22. ábra) vagy a kalcineurin PxlIT-kötőhelyének szaturációja VIVIT peptiddel (32.A ábra) teljesen kivédi a TRESK kalcium-függő aktivációját. Ennek ellenére ezek a kezelések nem befolyásolták a TRESK bazális aktivitást (legalábbis a vizsgált petepreparátumban, 32.B ábra). Egyes (jó minőségű) oocyta preparátumokban tehát a TRESK bazális aktivitás független a kalcineurin működésétől.

A TRESK és kalcineurin közvetlen kötődését biokémiai kísérlettel is megerősítettem. A PQIVID motívum közvetlen kalcineurin kötésének bizonyítására GST “pulldown” kísérleteket végeztem a glutation-rezinen immobilizált GST-TRESKloop-TAPtag fúziós fehérjével és a rekombináns konstitutívan aktív kalcineurinnal. A GST-TRESKloop-TAPtag csalifehérje a TRESK intracelluláris hurok régió teljes egészét (164-292 aminosavak) tartalmazta. A TAPtag fehérjerészletet nem használtam a csalifehérje tisztítása során, ennek jelentősége a nagyobb molekulásúly elérése volt, ezzel együtt a csalifehérje mérete meghaladta a konstitutívan aktív kalcineurin A alegységét. A konstitutívan aktív kalcineurin heterodimert *E. coli*-ban termeltettem. A csonkolt A (1-398 aminosavak) és teljes B alegységet kódoló bicisztronos plazmiddal kotranszformáltam a mirisztoil-transzferázt kódoló plazmidot is, hogy létrejöjjön a szükséges poszttranszlációs módosítás a B alegységen. A kalcineurin A alegység N-terminálisra szerkesztett hexahisztidin segítségével tisztítottam a fehérjét Ni-NTA agarózzal. A csonkolt A alegység nem tartalmazta az autoinhibitoros és kalmodulin-kötő doméneket, de a B alegység-kötő régió megtartott volt. A rekombináns kalcineurin *in vitro* defoszforilálta a p-nitrofenilfoszfát (pNPP) szubsztátot és TRESK-expresszálo petesejtekbe mikroinjektálva aktiválta a háttér  $K^+$  áramot (*az adatokat nem mutatom*).

A glutation-rezinen immobilizált GST-TRESKloop-TAPtag csalifehérjét inkubáltunk a rekombináns konstitutívan aktív kalcineurinnal, majd a nem kötő fehérjéket két gyors mosási lépéssel eltávolítottuk. A rezinen maradó fehérjék között könnyen felismerhető volt a kalcineurin A alegység csíkja SDS-PAGE gélen Coomassie kék festéssel (33. ábra, A panel, vö. 1 és 2. sáv). Annak igazolására, hogy a kalcineurin tényleg a PQIVID motívumhoz kötődött a

csalifehérjében, ugyanezt a kísérletet elvégeztük a GST-TRESKloop-TAPtag PQAVAD mutáns változatával is azonos körülmények között. Jó egyezésben az elektrofiziológiai kísérletekkel (30. ábra), a PQAVAD mutáns csalifehérje egyáltalán nem kötötte a kalcineurint (33.A ábra, 3. és 4. sáv). Szintén analógiában az áram mérésekkel, a VIVIT peptid megakadályozta a kalcineurin kötődését a "vad típusú" (PQIVID) csalifehérjéhez (33.B ábra, 2. és 3. sáv). Ezek az *in vitro* kötési kísérletek meggyőzően igazolják, hogy a TRESK PQIVID motívuma és a kalcineurin PxlIT-kötőhelye között jön létre az interakció [4].



### 33. ábra: A kalcineurin közvetlenül kötődik az egér TRESK PQIVID motívumához

**A.** GST "pulldown" kísérletet végeztünk a "vad típusú" (PQIVID, wt.) vagy a PQAVAD mutáns (m.) GST-TRESKloop-TAPtag csalifehérjével, a konstitutívan aktív kalcineurin (CnA 1-398) jelenlétében vagy hiányában, ahogy azt az SDS-PAGE gél képe alatt jeleztem. A teljes hosszúságú fúziós protein (Teljes) mellett a csalifehérje bakteriális expressziója számos további (részlegesen transzlált vagy bomlott) terméket eredményezett (ld. 1. sáv). Ezek közül az egyik, kicsit a GST-nél nagyobb, fehérje különösen nagy mennyiségben volt jelen, ezt "GST"-vel jelöltem. A konstitutívan aktív kalcineurin preparátumból 2.5 µg-ot az 5. sávban futtattunk, a csonkolt kalcineurin A alegységet (CnA 1-398) nyíllal jelöltem. A 2. sávban kötődött a kalcineurin, a 4. sávban viszont nem. **B.** A konstitutívan aktív kalcineurin kötődését a "vad típusú" (PQIVID) GST-TRESKloop-TAPtag csalifehérjéhez vizsgáltam VIVIT peptid (200 µM) jelenlétében vagy hiányában,

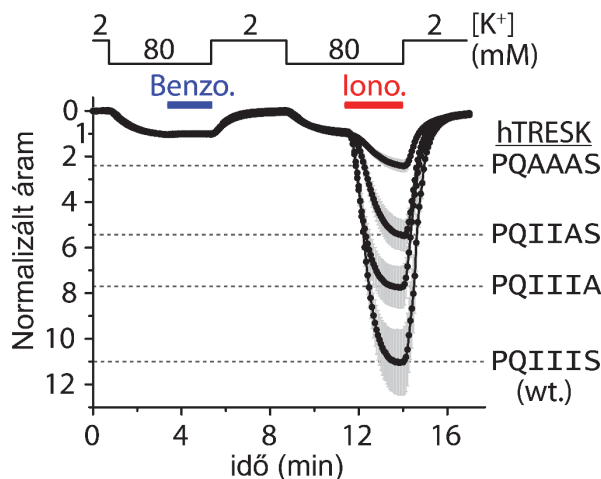
ahogy azt a gélkép alatt jeleztem. A 4. sávban csak a kalcineurint (2.5 µg) vittünk fel. A molekulásúlyokat a félbevágott markersávban tüntettem fel. A kalcineurin kötődött VIVIT peptid hiányában (2. sáv), de nem kötődött a peptid jelenlétében (3. sáv). **C.** GST "pulldown" kísérletet végeztünk a "vad típusú" (PQIVID) GST-TRESKloop fúziós fehérjével, Ca<sup>2+</sup> jelenlétében, és a szarvasmarha agyból származó vad típusú (SIGMA) kalcineurin, kalmódulin és VIVIT peptid (200 µM) jelenlétében vagy hiányában, ahogy azt a gélkép alatt jeleztem. A teljes hosszúságú (Teljes) és részleges (GST) fúziós fehérjét és a teljes hosszúságú vad típusú kalcineurin A alegységet (CnA, 0.5 µg, 1. sáv) nyílakkal jelöltem. A kalcineurin kötődött a csalifehérjéhez a 4. sávban (nyíllal és csillaggal jelöltem). Az A és B paneleken a reprezentatív SDS-PAGE géleket Coomassie kékkel festettük, a C panelen bemutatott gélen pedig ezüst festéssel tettük láthatóvá a fehérjéket. Módosítva a [4] közleményből.

A rekombináns konstitutívan aktív foszfatázzal nem lehetett vizsgálni a TRESK-kalcineurin interakció kalcium-függését, hiszen a csonkolt A alegység nem tartalmazta a kalcium/kalmodulin-kötő régiót. Ezért megvásároltuk a szarvasmarha agyból tisztított vad típusú kalcineurint (SIGMA) és ezzel a teljes hosszúságú enzimmel is megerősítettük, hogy a kalcineurin kötődik a TRESK csatornához (33.C ábra). Ebben a kísérletben a GST-TRESKloop csalféhérjét használtuk (33.C ábra, 2. sáv), mert ennek a mérete különbözött a teljes hosszúságú kalcineurin A alegységtől (*CnA*, 1. sáv). A kalcineurin erősebben kötődött a csalféférjéhez a kalcium/kalmodulin komplex jelenlétében (4. sáv), mint annak hiányában (3. sáv). Az interakció kialakulását ebben a kísérletben is megakadályozta a VIVIT peptid (5. sáv). A vad típusú kalcineurin affinitását a TRESK intracelluláris hurok régió iránt megnövelte tehát a foszfatáz aktivációja a kalcium/kalmodulin komplex kötésekor. A kalcineurin kötődése a TRESK csatornához nem kizárólag statikus, állványfehérje-szerű mechanizmus, hanem az interakció bizonyos mértékben függhet a kalcium jel dinamikájától és az ennek hatására változó foszfatáz aktivitástól is. Ez az eredmény váratlan abban a tekintetben, hogy a PxlIT motívum kalcineurin kötéséről elfogadott az irodalomban, hogy az a foszfatáz aktivációjától függetlenül alakul ki [273-276].

## 5.9 A humán TRESK alegység két kalcineurin-kötőhelyet tartalmaz

A nagy affinitású közvetlen fehérje-fehérje interakciók ismerete általános jelentőségű, hiszen ezek várhatóan kevés mellékfeltétellel kialakulnak minden olyan biológiai rendszerben, ahol a két fehérje együtt van jelen. Mindemellett, tudomásunk szerint a TRESK az egyetlen ismert plazmamembránban található ioncsatorna, amely PxlIT-szerű kötőmotívumot tartalmaz és közvetlen módon asszociálódik a kalcineurin foszfatázzal. Ezért fontosnak éreztem, hogy az interakciót megvizsgáljam az orvosbiológiai szempontból lényegesebb humán TRESK csatorna esetében is, amelyben a PQIIS kötő szekvencia nem egyezik pontosan az egér ortológéval.

Így tehát megmértem, hogyan reagálnak az ionomycinnel kiváltott citoplazma  $[Ca^{2+}]$  növekedésre azok a humán TRESK mutánsok, amelyekben a PQIIS motívum egyes aminosavait alanin helyettesíti (34. ábra) [9].

**34. ábra: A PQIIIS motívum mutációi csökkentik a humán TRESK csatorna kalcium-függő aktivációját**

A 30.A ábrán láthatóhoz hasonló kísérletet végeztem a humán TRESK csatornával. A vad típusú (*PQIIIS*, wt.), illetve *PQIIIA*, *PQIIAS* vagy *PQAAAS* mutáns TRESK csatornát kifejező *Xenopus* petesejteket ( $n=4 \times 10$ ) ionomycinnel ( $0.5 \mu\text{M}$ , Iono., *piros*) ingereltem, miután a bazális  $\text{K}^+$  áramok benzocain ( $1 \text{ mM}$ , Benzo., *kék*) iránti érzéketlenségéről megbizonyosodtam. Módosítva a [9] közleményből.

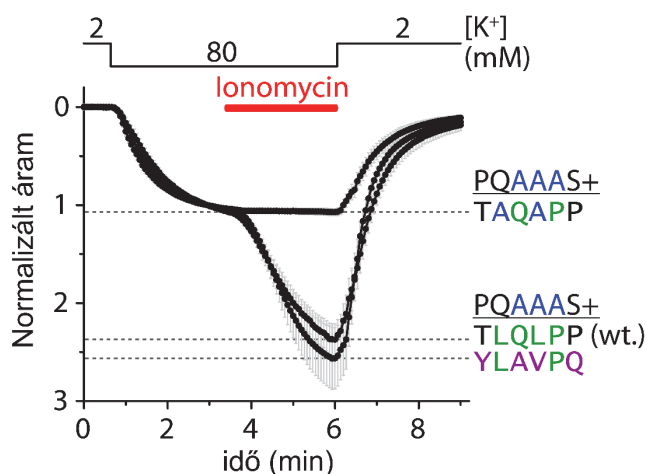
Ahogy az egér TRESK csatornánál történt (30.A ábra), úgy a humán TRESK kalcium-függő aktivációját is drámai módon csökkentette a PQIIIS motívum elroncsolása alanin mutációkkal (34. ábra). A PQAAAS mutáns aktivációja ( $2.4 \pm 0.3$ -szoros,  $n=10$ ) szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusú, intakt PQIIIS motívumot tartalmazó csatornáé ( $11.0 \pm 1.4$ -szeres,  $n=10$ ,  $p < 10^{-4}$ ). Az összes vizsgált mutáns csatorna nyugalmi áramának benzocain érzékenysége megegyezett a vad típusú csatornáéval, ami arra utal, hogy a csökkent kalcium-függő aktiváció nem a bazális aktivitás fokozódása miatt jelentkezett, hanem tényleg az aktivációs folyamat károsodott.

Mindazonáltal, a humán PQAAAS mutánssal kapott eredmény szembeötlő módon különbözött az egér PQAVAD mutáns ionomycinre adott válaszáétól. Míg a PQAVAD mutáció teljesen megszüntette az egér TRESK kalcium-függő aktivációját (30. ábra), addig a PQAAAS mutáns humán csatorna még mindig több mint kétszeresére aktiválódott ionomycin hatására (34. ábra). Mivel valószínűnek tűnt, hogy a tripla alanin mutáció teljesen kivédi a PQIIIS motívum kalcineurin kötését, ezért arra gondoltam, hogy a humán TRESK csatorna tartalmaz még egy kalcineurin-kötő motívumot.

Az NFAT kalcineurin kötéséről ismert, hogy abban a PxlIT konszenzus motívum mellett egy másik, LxVP kalcineurin-kötő szekvencia is szerepet játszik [277-280]. Ha az evolúció folyamán a TRESK intracelluláris hurok régió úgy fejlődött, hogy az NFAT PxlIT motívumhoz hasonlóan adaptálódott a hatékony kalcineurin kötés érdekében, akkor miért ne ölthette volna magára a még egyszerűbb, három determinált elemű lineáris LxVP kötőhelyet is? A

humán és egér TRESK csatorna azonban nem tartalmaz LxVP konszenzusnak megfelelő szekvenciát. A humán TRESK csatornában a leginkább hasonló szekvencia az LQLP. Ezért azt kezdtem vizsgálni, hogy az LQLP hozzájárul-e a kalcineurin hatásához.

Feltételeztem, hogy a PQAAAS mutáns csatorna kalcium-függő aktivációjáért tisztán a második (még ismeretlen) kalcineurin-kötőhely felelős, tehát ebben a PQAAAS mutáns kontextusban módosítottam az LQLP szekvenciát. Egyrészt megkíséreltem az LQLP-t dupla alanin mutációval funkciótelennek tenni, az AQAP mutáns formájában, másrészt pedig helyettesíteni az NFAT kanonikus LxVP motívumával. Mivel ismert volt, hogy az LxVP motívumot közvetlenül megelőző és követő aminosav is befolyásolja a kötés erősségét [278,281], ezért a humán TRESK TLQLPP szekvenciáját YLAVPQ-ra módosítottam, az NFAT kalcineurin-kötőhelyének megfelelően (35. ábra) [9].



**35. ábra: Az LQLP motívum hozzájárul a humán TRESK kalcineurin-függő aktivációjához**

Három különböző humán TRESK konstrukció (n=3×12 petesejt) normalizált, ionomycin (0.5  $\mu$ M, *piros*) adásával kiváltott, aktivációját ábrázoltam. Mindhárom konstrukció tartalmazta a PQAAAS mutációt. Az LQLP motívum megtartott volt a TRESK-PQAAAS konstrukcióban (ld. *TLQLPP*, wt. görbe); roncsolt volt a TRESK-PQAAAS-TAQAPP konstrukcióban (*TAQAPP* görbe);

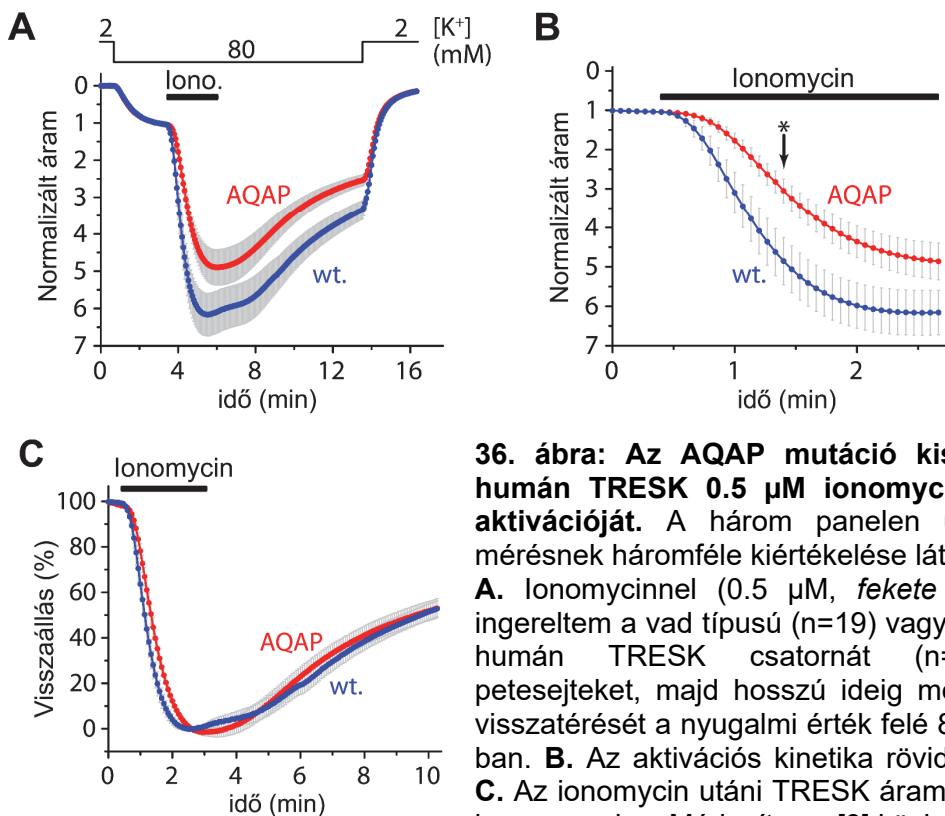
vagy helyettesítettük az NFATc1 (NFAT2) megfelelő motívumával a TRESK-PQAAAS-YLAVPQ konstrukcióban (*YLAVPQ* görbe). A maximális aktivációs szinteket szaggatott vonallal, az ezeknek megfelelő mutánsokat pedig a panel jobb oldalán feliratozva adtam meg. A vad típusú LQLP szekvenciát *zölddel* jelöltem, a funkcióvesztő alanin cseréket *kékkel*, az NFAT-nak megfelelő szubsztitúciókat pedig *lilával*. A  $K^+$  áramokat a 21.B ábrának megfelelő protokoll szerint mértem. A *TAQAPP* mutáns nem aktiválódott, az *YLAVPQ* viszont hasonlóan működött, mint a *TLQLPP* kontroll konstrukció. Módosítva a [9] közleményből.

A PQAAAS mutáns háttérben alkalmazva az AQAP mutáció teljesen kivédte a humán TRESK kalcium-függő aktivációját. Amíg a PQAAAS mutáns a várt módon kb. kétszeresre aktiválódott ( $2.27 \pm 0.15$ -szörösre, n=12), addig a PQAAAS és AQAP mutációkat egyaránt tartalmazó konstrukció árama nem

változott ionomycin hatására ( $1.07 \pm 0.03$ -szoros áram növekedés,  $n=12$ , 35. ábra,  $p < 10^{-7}$ ). Vagyis az LQLP motívumon alapul a PQIIIS kötőhely kiiktatása után még fennmaradó kalcineurin-függő TRESK aktiváció [9].

Ha a PQAAAS mutációt is tartalmazó csatornában az LQLP régiót az NFAT megfelelő kalcineurin-kötőhelyével helyettesítettük (35. ábra, *YLAVPQ* konstrukció), akkor ez  $0.5 \mu\text{M}$  ionomycin hatására teljesen hasonlóan aktiválódott, mint a változatlan LQLP szekvenciát magába foglaló PQAAAS mutáns TRESK csatorna (35. ábra, *TLQLPP*). Vagyis az NFAT kanonikus LxVP motívuma működőképes módon helyettesítette a humán TRESK natív LQLP szekvenciáját [9].

A PQAAAS háttérben végzett mutációs kísérletek egyértelműen bizonyították az LQLP motívum szerepét a TRESK szabályozásban, azonban vajmi keveset árultak el arról, hogy mi lehet az LQLP jelentősége a vad típusú csatornában és egyáltalán miért van szükség két különböző kalcineurin-kötőhelyre ugyanabban a fehérjében. Ezeken a kérdéseken tűnődve megvizsgáltam annak a TRESK konstrukciónak a kalcium-függő aktivációját, amelyben csak az LQLP motívum volt mutáns (36. ábra).



**36. ábra: Az AQAP mutáció kissé lassítja a humán TRESK  $0.5 \mu\text{M}$  ionomycinnel kiváltott aktivációját.** A három panelen ugyanannak a mérésnek háromféle kiértékelése látható.

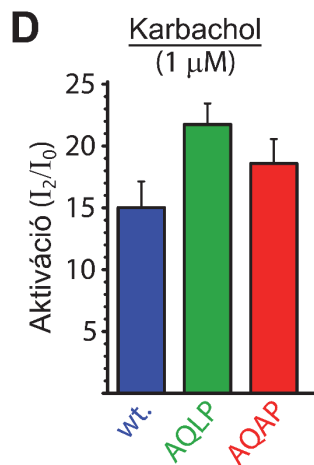
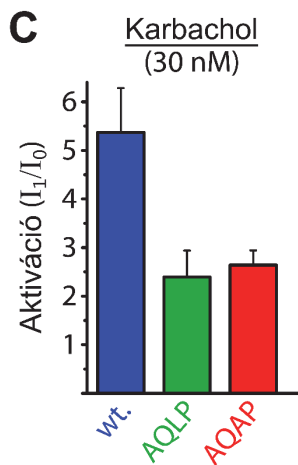
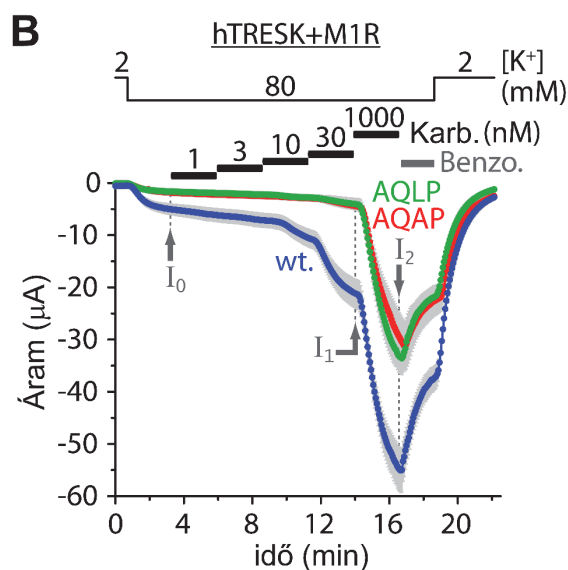
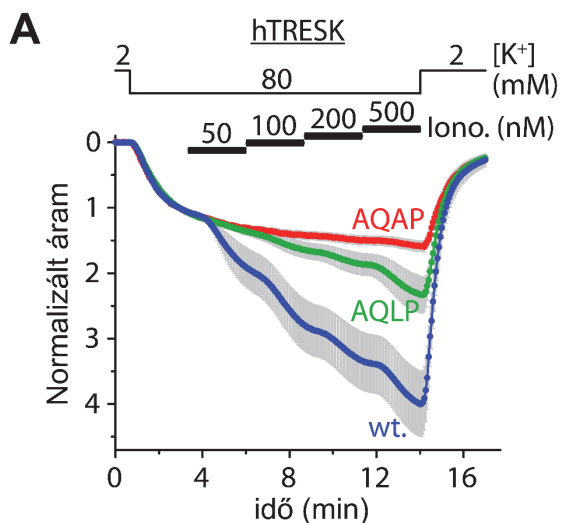
**A.** Ionomycinnel ( $0.5 \mu\text{M}$ , fekete vastag vonal) ingereltem a vad típusú ( $n=19$ ) vagy AQAP mutáns humán TRESK csatornát ( $n=21$ ) kifejező petesejteket, majd hosszú ideig mértem az áram visszatérését a nyugalmi érték felé  $80 \text{ mM}$  EC  $[K^+]$ -ban. **B.** Az aktivációs kinetika rövidebb időskálán. **C.** Az ionomycin utáni TRESK áram visszaállás %-ban megadva. Módosítva a [9] közleményből.

Az AQAP mutáns humán TRESK csatorna 0.5  $\mu$ M ionomycinnel kiváltott kalcium-függő aktivációja csak kis mértékben különbözött a vad típusú csatornától. A TRESK-AQAP ionomycin hatására létrejövő relatív  $K^+$  áram növekedése ( $4.8 \pm 0.5$ -szörös,  $n=21$ ) nem különbözött szignifikánsan a vad típusú csatorna végső aktivációjától ( $6.2 \pm 0.6$ -szoros,  $n=19$ , 36.A ábra,  $p=0.08$ ). Azonban a vad típusú csatorna kissé gyorsabban aktiválódott, mint az AQAP mutáns. A 36. ábra B panelen *csillaggal* jelölt időpontban a részleges relatív aktivációs szintek szignifikánsan különböztek az AQAP mutáns ( $3.1 \pm 0.3$ -szoros) és a vad típusú csatorna ( $4.9 \pm 0.6$ -szoros,  $p<0.01$ , Student t-teszt) között. Az aktivációs sebességek (% aktiváció/sec egységeken számítva) szintén szignifikánsan különböztek a két csoportban (*az adatokat nem mutatom*). Tehát az AQAP mutáció lelassította a masszív citoplazma [ $Ca^{2+}$ ] növeléssel kiváltott humán TRESK csatorna aktivációt, azonban nem (vagy csak alig) változtatta az aktiváció végső maximális mértékét. Az AQAP mutáció szintén nem befolyásolta a TRESK gátló (vissza)foszforilálásáért felelős kináz reakciót, ahogy ezt a változatlan  $K^+$  áram visszaállási kinetika mutatta az ionomycin elvonását követően (36.C ábra).

A TRESK-AQAP mutáns lassult aktivációja adta az ötletet, hogy az LQLP hely hozzájárulhat a TRESK szabályozási folyamat kalcium-érzékenységéhez. A hipotézis vizsgálatára összehasonlítottam a vad típusú humán TRESK és az AQAP mutáns változat, lépésenként növekvő koncentrációjú ionomycinnel (50, 100, 200, 500 nM) kiváltott aktivációját (37. ábra, A panel). Ez az ingerlés lassan növeli a citoplazma kalcium koncentrációt és alkalmas a TRESK mérsékelt [ $Ca^{2+}$ ] emelkedésre adott válaszának vizsgálatára. A fokozatosan növekvő koncentrációjú ingerlés végén, 500 nM ionomycin jelenlétében, a végső [ $Ca^{2+}$ ] azonban valószínűleg alacsonyabb, mint az 500 nM koncentrációjú ionomycin azonnali adása után kialakuló kalcium szint, mivel a kalcium fő forrása, az intracelluláris raktár az elnyújtott ingerlés folyamán kiürül [268,269].

A vad típusú humán TRESK csatorna kifejezetten aktiválódott a lépésenkénti ionomycin ingerlés végére ( $4.0 \pm 0.5$ -szörös  $K^+$  áram növekedés az 500 nM lépés végén,  $n=10$ , 37.A ábra, *kék wt. görbe*). Ezzel szemben a

TRESK-AQAP mutáns sokkal kevésbé reagált a  $[Ca^{2+}]$  mérsékelt növekedésére azonos körülmények között ( $1.6 \pm 0.1$ -szeres aktiváció,  $n=12$ ,  $p < 10^{-4}$ , 37.A ábra, *piros AQAP* görbe).



**37. ábra: Az LQLP motívum mutációi csökkentik a TRESK aktivációs folyamat kalcium iránti érzékenységét**

**A.** A vad típusú (*wt.*, LQLP,  $n=10$ , *kék*), illetve AQLP (*zöld*,  $n=12$ ) vagy AQAP (*piros*,  $n=12$ ) mutáns humán TRESK csatornákat kifejező petesejteket lépésenként növekvő koncentrációjú (50, 100, 200, 500 nM) ionomycinnel ingereltem (ahogy a *vastag fekete vonalak* mutatják). A vad típusú csatorna kifejezetten, az AQAP mutáns viszont alig aktiválódott.

**B.** Az oocyták három csoportja a vad típusú (*wt.*, LQLP,  $n=11$ , *kék*), az AQLP (*zöld*,  $n=9$ ), vagy az AQAP mutáns (*piros*,  $n=8$ ) TRESK csatornát koexpresszált az M<sub>1</sub> muszkarinos acetilkolin receptorral. A mérsékelt  $[Ca^{2+}]$  növekedést karbachol (*Karb.*) lépésenként (1, 3, 10, 30 nM) növekvő koncentrációival idéztem elő (ahogy a *vastag fekete vonalak* mutatják). Ezt követően masszív kalcium szignált hoztam létre 1  $\mu$ M karbachollal. Végül a K<sup>+</sup> áramok benzocain (1 mM) érzékenységét teszteltem (*szürke vonal*, *Benzo.*). Az AQLP és AQAP mutánsok kevésbé aktiválódtak alacsony [karbachol] hatására, azonban jelentős áram növekedéssel válaszoltak a magas agonista koncentrációra. (A *zöld* AQLP és *piros* AQAP görbék nagyrészt átfednek.)

**C.** Az alacsony (1–30 nM) [karbachol]-ra adott válaszokat az  $I_1/I_0$  hányadosokból számítottam (ld. B panel, *szürke függőleges nyílak*).

**D.** A magas (1  $\mu$ M) [karbachol]-ra adott válaszokat az  $I_2/I_0$  hányadosokból számítottam. Az AQLP és AQAP mutánsok ugyanúgy (vagy nagyobb mértékben) aktiválódtak, mint a vad típusú csatorna.

Módosítva a [9] közleményből.

Az egyetlen alanin cserét tartalmazó AQLP mutáns (L240A pontmutáns) aktivációja szintén gyengült ( $2.3 \pm 0.3$ -szoros növekedés,  $n=12$ , 37.A ábra, *AQLP* görbe); a vad típus és az AQAP mutáns közötti átmeneti válaszreakciót mutatott. Fontos leszögezni, hogy ugyanebben a petepreparátumban a vad típusú és AQAP mutáns TRESK csatornák megegyező választ mutattak 500 nM ionomycin azonnali adására ( $n=2 \times 6$ , az *adatokat nem mutatom*). Ezek az eredmények egyértelműen mutatják, hogy az LQLP motívum mutációi lerontották a csatorna válaszreakcióját a mérsékelt  $[Ca^{2+}]$  növekedésre, azonban a magas  $[Ca^{2+}]$ -ra létrejövő aktiváció változatlan maradt [9].

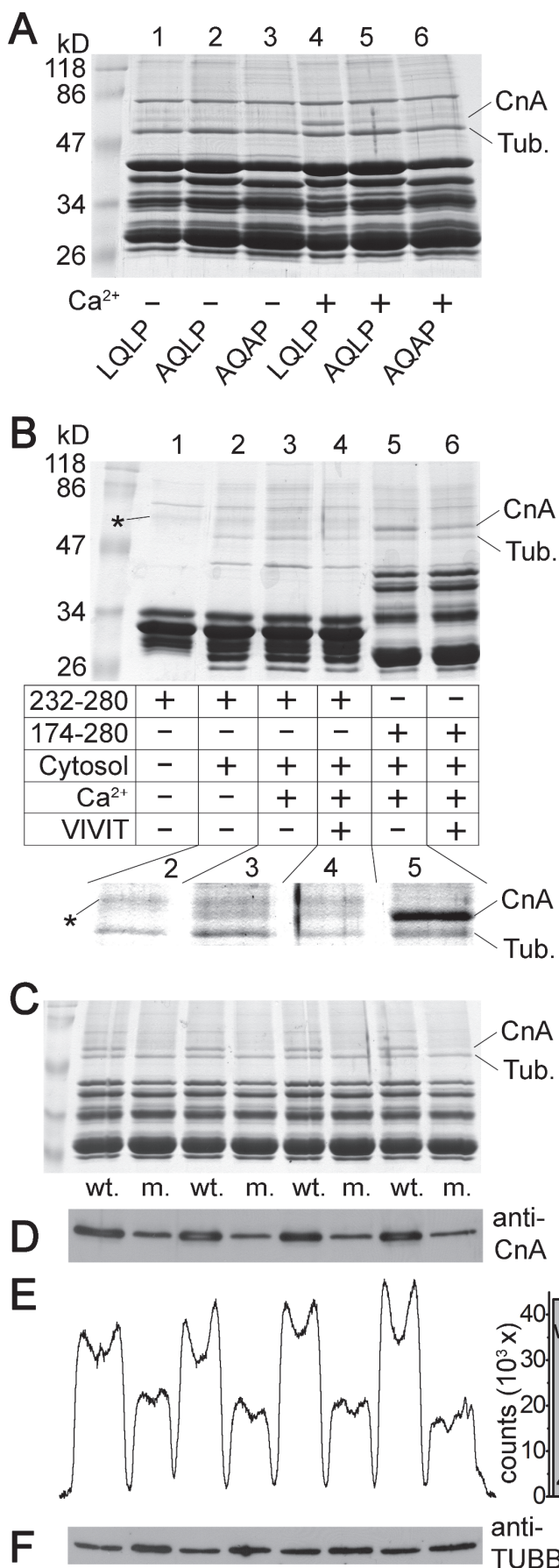
Az ionomycin koncentráció fokozatos növelésével az igényeknek megfelelően tudtam kísérletesen kontrollálni a citoplazma  $[Ca^{2+}]$ -t, azonban szerettem volna meggyőződni arról, hogy az LQLP motívum meghatározó tényezője a TRESK aktiváció kalcium-érzékenységének fizioológiasabb kalcium jel esetén is. Ezért karbachollal aktiváltam az  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort olyan petesejtekben, amelyek a receptorral a vad típusú, illetve AQLP vagy AQAP mutáns csatornákat koexpresszálták (37. ábra, B-D panelek). Ebben a kísérletben ugyanabban a sejtben vizsgálhattam a mérsékelt és erőteljes  $[Ca^{2+}]$  növekedés hatásait a  $K^+$  áramra. A mérsékelt  $[Ca^{2+}]$  növekedést a karbachol fokozatosan 1-től 30 nM-ig növekvő koncentrációival váltottam ki, a mérés végén pedig erőteljes  $[Ca^{2+}]$  emelkedést hoztam létre 1  $\mu M$  agonista koncentrációval. A mérsékelt  $[Ca^{2+}]$  növelés a vad típusú TRESK csatornát  $5.4 \pm 0.9$ -szeresre ( $n=11$ , 37.B, *kék wt. görbe*) aktiválta, az AQLP mutánst  $2.4 \pm 0.5$ -szörösre ( $n=9$ , *zöld AQLP görbe*), az AQAP mutánst pedig  $2.6 \pm 0.3$ -szorosra ( $n=8$ , *piros AQAP görbe*). Az AQAP mutáns aktivációja szignifikánsan kisebb volt a vad típusú csatornához hasonlítva kétmintás Student t-teszttel (37.C ábra,  $p < 0.03$ ). A receptor ingerléssel nyert adatok tehát megerősítették az ionomycinnel végzett kísérletekből levont következtetést, az intakt LQLP motívum lehetővé teszi a TRESK aktivációs folyamat megfelelő érzékenységét a mérsékelt  $[Ca^{2+}]$  növekedésre [9].

Az 1  $\mu M$  karbachollal létrehozott erőteljes receptor ingerlés hatására viszont az AQLP és AQAP mutánsok relatív aktivációja ugyanakkora volt (vagy még nagyobb is), mint a vad típusú TRESK csatornáié (37. ábra, B és D panel).

A kalcium-függő aktivációs mechanizmus tehát működőképes az AQLP és AQAP mutáns csatornában is, de magasabb  $[Ca^{2+}]$  szükséges a beindításához, mint a vad típusú TRESK esetében. A magas (1  $\mu M$ ) [karbachol] adását követően, a vad típusú, illetve AQLP és AQAP csatornák hozzávetőlegesen hasonló aktiváltsági állapotot értek el, amelyet az áramuk benzocain (1 mM) iránti egyenlően megnövekedett érzékenysége mutat (37. B). A vad típusú és AQAP mutáns TRESK különböző cRNS mennyiségeinek mikroinjektálásával, további kísérletben igazoltam, hogy az AQAP mutáns aktivációjának kisebb kalcium-érzékenysége teljesen függetlenül érvényesül a csatornák expressziós szintjétől (*az adatokat nem mutatom*) [9].

A fenti elektrofiziológiai mérésekből levont legfontosabb következtetéseket biokémiai szemszögből átfogalmazhatjuk a következőképpen. A humán TRESK csatorna LQLP szekvenciája köti a kalcineurint és az AQAP mutáns csatorna defoszforilációs sebessége mérsékelt kalcineurin aktivitás esetén kisebb, mint a vad típusú csatornáé. Ezek az állítások tisztán biokémiai módszerekkel is vizsgálhatók és ezáltal az alábbiakban bemutatott *in vitro* kísérletek lehetővé tették a következtetéseink független megerősítését.

Glutation-S-transzferáz (GST) “pulldown” kísérleteket végeztünk a humán TRESK intracelluláris hurok régióját (174-280 aminosavak), illetve annak AQLP vagy AQAP mutáns változatát, tartalmazó fúziós fehérjékkel egér agy citoszolból (38. ábra, A panel). A glutation rezinen immobilizált csalfehérjéket együtt inkubáltuk egér agy citoszollal, majd a nem kötődő fehérjéket eltávolító mosási lépések után, a rezinnel együtt centrifugált interakciós partnereket SDS-PAGE gélen Coomassie Blue festéssel megjelenítettük. Az interakciókat kalcium jelenlétében és hiányában is vizsgáltuk. (A citoszol preparátumhoz 1 mM kalciumot vagy 2 mM EGTA-t adtunk, a szabad  $[Ca^{2+}]$ -t nem mértük.) A kalcineurin A alegység és tubulin interakciós partnerek intenzív csíkjait (*CnA* és *Tub.*, ld. a 4. sávot a 38.A ábrán) lokalizációjuk alapján felismertük a gélen [9], mert ezeket hasonló kísérletekben peptidfragmens tömegspektrometriával meghatároztattuk (ld. az interakciós partnerekről szóló alábbi 5.10 fejezetben) [8].



### 38. ábra: A humán TRESK LQLP motívuma köti a kalcineurint

**A.** GST "pulldown" kísérleteket végeztünk a humán TRESK intracelluláris hurok régiót (174-280 aminosav, *LQLP*, 1. és 4. sáv), illetve annak *AQLP* (2. és 5. sáv) vagy *AQAP* mutáns változatát (3. és 6. sáv) tartalmazó fúziós fehérjékkel egér agy citoszolból. A kalcineurin kötést vizsgáltuk kalcium hiányában (1.-3. sáv) és jelenlétében (4.-6. sáv). A két ismert interakciós partnert, a kalcineurin A alegységet (*CnA*) és tubulint (*Tub.*) jelöltük a Coomassie késsel festett SDS-PAGE gél *jobb oldalán*. A kalcineurin nagy mennyiségben kötődött a vad típusú TRESK hurok fehérjéhez kalcium jelenlétében (4. sáv), azonban az *AQLP* és *AQAP* mutációk (5. és 6. sáv), vagy a kalcium kelálása (1. sáv) drámaian csökkentette az interakciót. (A 47 kD alatti teljes csalifehérjén kívül a preparátum tartalmazott számos részlegesen transzlált fragmenst és egy kifejezett bakteriális szennyező fehérjét 86 kD alatt.)

**B.** GST "pulldown" kísérleteket végeztünk a humán TRESK 232-280 fragmenssel, amely az *LQLP* motívumot tartalmazta, de a *PQIIIS*-t nem (1.-4. sáv), illetve az 174-280 fragmenssel, amelyben mindkét kötőhely megtalálható (5. és 6. sáv). A csalifehérje típusát, a citoszol hozzáadását, a Ca<sup>2+</sup> és VIVIT peptid jelenlétét vagy hiányát a táblázatban adtam meg. A tubulin (*Tub.*) és kalcineurin A (*CnA*) interakciós partnereket *jobb oldalon* jelöltem. A 232-280 csalifehérjében található halvány bakteriális szennyező csíkot *csillag* mutatja. A gélkép leglényegesebb részét nagyítva

és növelt kontraszttal mutatom a táblázat alatt. A TRESK 232-280 fragmens csak kalcium jelenlétében kötötte a kalcineurint (3. sáv), annak hiányában nem (2. sáv). A VIVIT peptid (75  $\mu$ M) csökkentette a 174-280 fragmens kalcineurin kötését (5. vs. 6. sáv), de nem befolyásolta a foszfátáz kötődését a 232-280 fragmenshez (3. vs. 4. sáv). **C.** Statisztikai kiértékeléshez négy pár független "pulldown" reakciót készítettünk a GST-hTRESK(174–280) (*wt.*) és GST-hTRESK(174–280)-AQAP mutáns (*m.*) csalfelhérjéssel úgy, mint az A panel 4. és 6. sávjában. A mintákat SDS-PAGE gélen futtattuk és Coomassie késsel festettük.

**D.** Ugyanazokból a mintákból, mint a C panelen, kalcineurin A-ra specifikus antitesttel (*anti-CnA*) immunoblottal mutattuk ki a foszfátáz.

**E.** A D panelen bemutatott immunoblot denzitometriás görbáját és a mért denzitásokból számított oszlopdiagramot ábrázoltam. Szignifikánsan több kalcineurin kötődött a vad típusú (LQLP) konstrukcióhoz, mint az AQAP mutáns változathoz ( $p < 10^{-5}$ , Student t-teszt).

**F.** A D panelen bemutatott membránról eltávolítottuk az előző antitesteket és tubulin  $\beta$ 3-ra specifikus antitesttel (*anti-TUBB3*) újabb immunoblottot készítettünk. Látható, hogy az AQAP "pulldown" reakciókból (*m.*) nem vittünk fel kevesebbet a géltre, mint az LQLP (*wt.*) reakciókból. Módosítva a [9] közleményből.

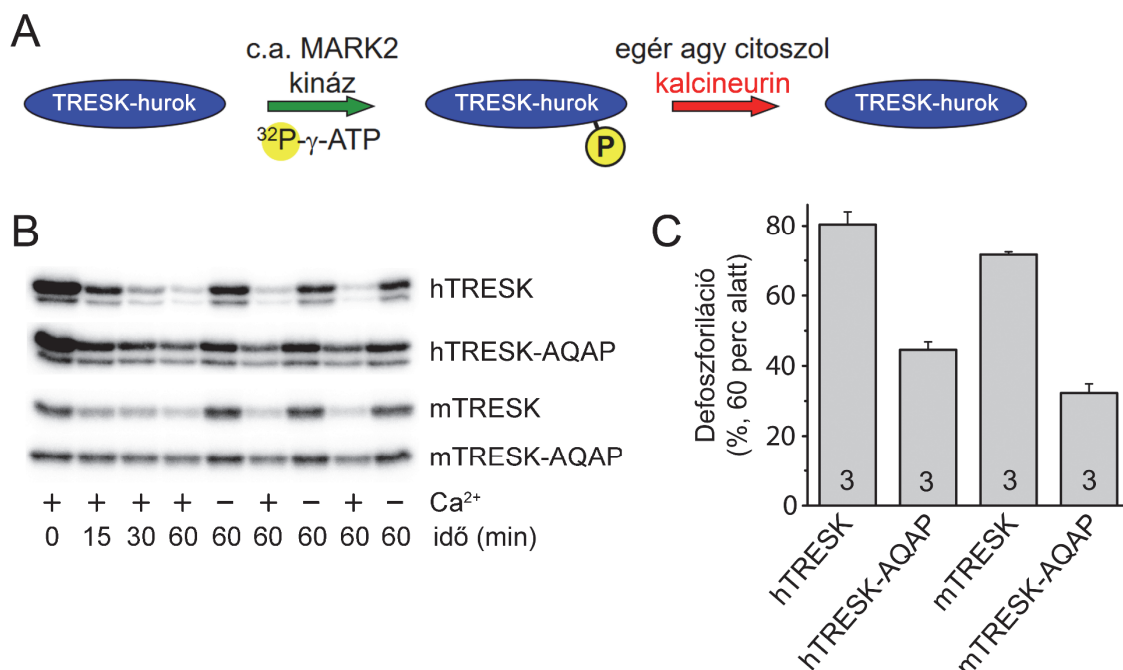
---

Az AQLP és AQAP mutációk nagyon kifejezetten csökkentették a kalcineurin kötődését a TRESK intracelluláris hurok régióhoz kalcium jelenlétében (38.A ábra, 4.-6. sávok). Ez azt mutatja, hogy az adott kísérleti körülmények között, az LQLP motívum a kalcineurin kötés jelentős tényezője. Kalcium hiányában a vad típusú konstrukció kalcineurin kötése nagymértékben csökkent (38.A ábra, 1. vs. 4. sáv), vagyis a kalcineurin egyértelműen kalcium-függő módon kötődött a mindkét (PQIIIS és LQLP) motívumot tartalmazó TRESK hurok részlethez. Habár a jelentősen hígult citoszollal végzett kísérlet körülményei kiválóan alkalmasak voltak az LQLP motívum kalcineurin kötésének kimutatására, azt mindenképpen meg kell jegyezni, hogy a "pulldown" reakcióban a kalcineurin és kalmodulin koncentrációk jóval alacsonyabbak lehettek, mint a citoplazmában. Valószínű, hogy magasabb [kalcineurin] mellett a PQIIIS motívum önmagában nagyobb mértékű kalciumtól független kalcineurin kötést eredményezett volna. A csalfelhérjéhez kötődő kalcineurint specifikus antitest segítségével Western blot kísérlettel is kimutattuk (38.C és D). Denzitometriával és statisztikai analízissel igazoltuk, hogy az LQLP motívumot tartalmazó fehérjéhez tényleg több kalcineurin kötődött, mint az AQAP mutánshoz (38.C-F).

A fenti kísérletekben a PQIIIS és LQLP motívumok együttes hatása határozta meg a kalcineurin kötődését. Az LQLP hely önálló szerepének

elkülönített vizsgálata céljából lerövidítettük a csalifehérjét oly módon, hogy abból a PQIIS motívum kimaradjon. Ez a GST-hTRESK(232-280) csalifehérje is kötötte a kalcineurint (ld. a 3. sávot a 38.B táblázat alatti felnagyított képen), azonban sokkal kisebb mértékben, mint a PQIIS motívumot is tartalmazó 174-280 fragmens (38.B ábra, 5. sáv). A VIVIT peptid csökkentette a kalcineurin kötődését a mindkét (PQIIS és LQLP) motívumot tartalmazó TRESK hurok részlethez (38.B ábra, 5. vs. 6. sáv). Ezzel szemben, a VIVIT peptid nem befolyásolta a kalcineurin kötését a csak LQLP motívumot tartalmazó csalifehérjéhez (38.B ábra, 3. vs. 4. sáv) [9], jó összhangban azzal az irodalmi adattal, hogy az LxVP és PxIXIT motívumok eltérő lokalizációban kapcsolódnak az enzimhez [280]. Az LxVP-re vonatkozó irodalmi adatoknak megfelelően, a kalcineurin kötődése az LQLP motívumhoz kalcium-függő, kalcium hiányában nem jött létre (38.B ábra, 2. vs. 3. sáv) [9]. Biokémiai eredményeink tehát teljes mértékben alátámasztják azt a következtetést, hogy a humán TRESK LQLP motívuma valódi kalcineurin-kötőhely, vagyis ennek működése felelős lehet az elektrofiziológiai mérésekben megfigyelt funkcionális következményekért.

A vad típusú (LQLP) és AQAP mutáns TRESK intracelluláris hurok régió defoszforilációs kinetikájának vizsgálatára a célfeladathoz optimalizált mérési módszert terveztem. A módszer első lépésében, a különböző GST-TRESK fúziós fehérjéket a szerin klaszter területén *in vitro* foszforiláltuk a Trx-His<sub>6</sub>-MARK2-T208E konstitutívan aktív kináz konstrukcióval [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP jelenlétében (ld. a későbbi kinázokról szóló 5.12 fejezetet). Ily módon előállítottuk a glutation rezinen immobilizált, radioaktívan jelölt szubsztrát fehérjéket. A következő lépésben ezeket hígított egér agy citoszollal inkubáltuk meghatározott ideig, kalcium jelenlétében vagy hiányában (39. ábra). Az agy citoszolban a messze legjelentősebb kalcium-függő foszfatáz aktivitást a kalcineurin jelenti, amely az összfehérje kb. egy százalékos hányadában van jelen [282], emellett a citoszol tartalmazza a szükséges kalmodulint is. A defoszforilációt követően a szubsztrátfehérjéket eluáltuk a rezinről, megfuttattuk SDS-PAGE gélen, majd radioaktivitásukat phosphorimager készülékkel mértük. A kalcium jelenlétében és hiányában defoszforilált minták összehasonlításával meghatároztuk a kalcium-függő defoszforiláció mértékét [9].



**39. ábra: A vad típusú TRESK *in vitro* kalcium-függő defoszfórációja gyorsabb, mint az AQAP mutánsé**

**A.** Az *in vitro* defoszfórációs kinetika becslésére szolgáló módszer folyamatábrája. (TRESK-huok: TRESK intracelluláris huok régiót tartalmazó, glutation-rezinen immobilizált GST fúziós fehérje; c.a. MARK2: Trx-His<sub>6</sub>-MARK2-T208E konstitutívan aktív rekombináns kináz) **B.** A radioaktívan jelölt GST-hTRESK(174–280) (*hTRESK*), GST-hTRESK(174–280)-AQAP (*hTRESK-AQAP*), GST-mTRESK(164–292) (*mTRESK*) és GST-mTRESK(164–292)-AQAP (*mTRESK-AQAP*) szubsztrát fehérjéket hígított egér agy citoszollal defoszfóráltuk, különböző ideig, kalcium jelenlétében vagy hiányában (ahogy az SDS-PAGE gél autoradiogramja alatti *feliratok* mutatják). A vad típusú TRESK-re jellemző szekvenciájú konstrukciók gyorsabban defoszfóráálódtak, mint az AQAP mutáns változataik, a humán és egér csatorna esetében egyaránt (ld. a 0, 15, 30 és 60 perces négy reakciót az ábra *bal oldalán*). A statisztikai kiértékeléshez, mind a négy szubsztrát fehérje típusból három pár független 60 perces defoszfórációs reakciót készítettünk, kalcium jelenlétében vagy hiányában (ld. a panel *jobb oldalán* a hat sávot). **C.** Ezeknek a csíkoknak a radioaktív beütésszámaiból meghatároztuk a kalcium-függő defoszfórációt százalékban és ezt oszlopdiagramon ábrázoltuk. A vad típusú szubsztrát proteinek gyorsabban defoszfóráálódtak, mint az AQAP mutánsok ( $p < 0.002$ , a humán és egér csatorna (*hTRESK* és *mTRESK*) esetén is, Student t-teszt, Bonferroni korrekció nélkül.) A humán TRESK huok szubsztrát preparátumokban egy részlegesen transzlált, teljes fúziós fehérjénél kisebb termék is foszfórálódtak és defoszfórálódtak, ezért ott két csíkot látunk minden mintában. Módosítva a [9] közleményből.

Ebben a kísérletben a humán és egér TRESK intracelluláris huok régiójának defoszfórációját is vizsgáltuk. Az egér TRESK LQPP szekvenciát tartalmaz a humán csatornában található LQLP helyén. Az egér LQPP szekvenciát is ugyanúgy AQAP-ra módosítottuk, mint a humán ortológban. A humán és egér TRESK vad típusú szekvenciát (LQLP vagy LQPP)

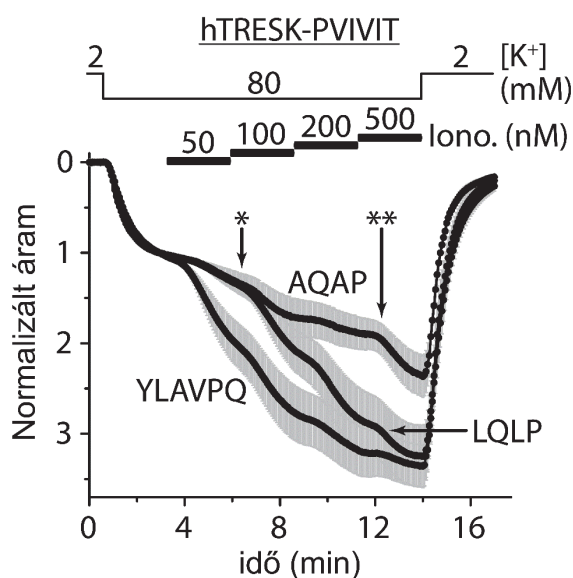
tartalmazó konstrukciók gyorsabban defoszforilálódtak kalcium-függő módon, mint az AQAP mutáns változatok (39.B és C ábra). Ez az *in vitro* eredmény megerősíti, hogy az eltérő defoszforilációs sebesség áll az elektrofiziológiai mérésekben tapasztalt funkcionális különbségek hátterében.

A humán TRESK csatornával kapott összes biokémiai és elektrofiziológiai eredmény egybehangzóan igazolja az LQLP motívum jelentőségét a kalcineurin-kötésben és a csatorna aktiváció kalcium-érzékenységének fokozásában. Az egér TRESK hurok LQPP motívum mutáció igen kifejezett hatása a defoszforilációs sebességre (39. ábra) azonban kissé váratlan eredmény. Arra utal, hogy az LQPP szekvencia is szerepet játszik a kalcineurin kötésben, habár az LxVP konszenzustól még jobban eltér, mint az LQLP. Ez utóbbi következtetés nem összeegyeztethetetlen az irodalmi adatokkal, hiszen a kalcineurin reguláló RCAN1 fehérjében LAPP motívum felelős a foszfatáz kötésért [283]. A kalcineurin kötődése az LQPP motívumhoz egyben megmagyarázhatja azt a megfigyelést, hogy a foszfatáz kalcium/kalmodulin-függő módon kapcsolódik az egér TRESK hurokhoz (33. ábra, C panel, 3. vs. 4. sáv). Szemben a PxIXIT motívummal, az LxVP kalcium-függő kötést biztosít az irodalmi adatok szerint [273-276,280,284]. Nehezebben összeegyeztethető viszont az LQPP szekvencia jelentős szerepe azzal az eredményünkkel, hogy az egér TRESK PxIXIT-szerű motívumának elrontása a PQAVAD mutációval teljesen kivédi a csatorna aktivációt (30. ábra). Ez azt sugallja, hogy (szemben az LQLP motívummal) az LQPP önmagában nem biztosít olyan mértékű kalcineurin kihorgonyzódást, amely a csatorna defoszforilációjához elegendő. Az egér TRESK csatorna második kalcineurin-kötőhelyével kapcsolatban bizonytalanság marad abban a tekintetben, hogy a fenti eredmények összessége értelmezhető-e egyszerűen azzal, hogy a kalcineurin LQPP hely iránti affinitása kisebb mértékű lehet, mint az LQLP motívum kötésé.

A humán TRESK csatorna PQIIS és LQLP kötőhelyek aktivációs mechanizmusban betöltött szerepének jobb megértése érdekében további kísérletet végeztem. Abból indultam ki, hogy ha a két kötőhely ugyanabban a folyamatban vesz részt és egyszerűen a kalcineurin csatornához rögzítéséért

felelős, akkor a funkciójuk redundánssá tehető. Ezért kicseréltem a PQIIIS szekvenciát a PVIVIT szekvenciával a csatornában, amelynek kalcineurin kötési affinitása ( $K_d=0.5 \mu\text{M}$ ) a Hogan munkacsoport mérései szerint hozzávetőlegesen egy nagyságrenddel meghaladja a PQIIIS-ét ( $K_d=5 \mu\text{M}$ ) [285]. Nem tudhatjuk biztosan, hogy az oocyta citoplazma kalcineurin koncentráció eléri-e azt a szintet, amely mellett a PVIVIT kötőhelyek többsége szaturálódik. Azonban ha igen, akkor a fenti hipotézis szerint ilyen esetben az LQLP kötőhely szerepének elhanyagolhatóvá kellene válnia, vagyis az LQLP mutációk hatástalansága várható a PVIVIT motívumot tartalmazó csatornában.

Megvizsgáltam tehát a PVIVIT mutáns humán TRESK csatornában az AQAP funkcióvesztő és az NFAT-szerű YLAVPQ kanonikus LxVP szubsztitúciós mutációk hatását a mérsékelt  $[\text{Ca}^{2+}]$  növekedéssel kiváltott aktivációs folyamatra (40. ábra).



**40. ábra: Az LQLP motívum mutációinak hatása érvényesül a TRESK-PVIVIT csatornában is**

A PQIIIS helyett PVIVIT szekvenciát tartalmazó humán TRESK csatornában (*hTRESK-PVIVIT*) vizsgáltam az LQLP motívum 35. ábrán részletesen bemutatott mutációinak hatását, a 37.A ábrán ismertetett módszer segítségével. A *csillaggal* jelölt időpontban az YLAVPQ csatorna szignifikánsan nagyobb mértékben aktiválódott, mint az LQLP; a *dupla csillaggal* jelölt időpontban pedig az AQAP mutáns aktiváció szignifikánsan kisebb volt, mint az LQLP csatornaé. A *szürke sávok* a szórást mutatják ( $n=3 \times 12$ , \* és \*\*  $p < 0.02$ , t-teszt). Módosítva a [9] közleményből.

A *hTRESK-PVIVIT-TAQAPP* (AQAP) csatorna kevésbé aktiválódott a fokozatosan növelt [ionomycin] stimulusra, mint a vad típusú *TLQLPP* szekvenciát tartalmazó *hTRESK-PVIVIT* mutáns (LQLP, 40. ábra). Hiába növeljük tehát a PxlIT-szerű kötőhely kalcineurin iránti affinitását nagymértékben, az ép LQLP motívum ilyenkor is fontos tényezője marad az alacsony  $[\text{Ca}^{2+}]$ -ra adott válasznak. Valószínűsíti ez, hogy a PVIVIT helyhez

már kihorgonyozott kalcineurin másodlagos kötődése az LQLP motívumhoz szerepet játszik a foszfatáz megfelelő térbeli pozicionálásában.

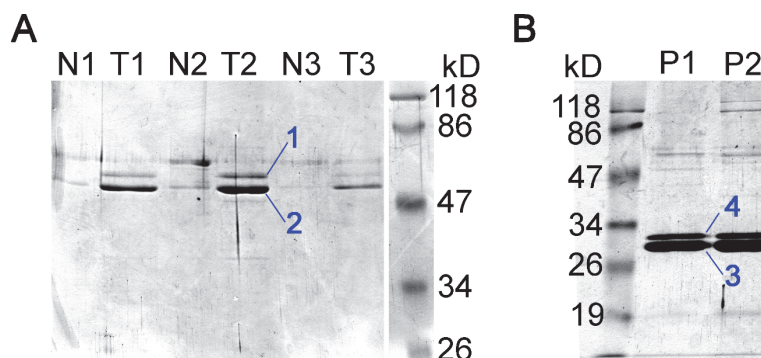
Ha a vad típusú TLQLPP szekvenciát a hTRESK-PVIVIT mutánsban az NFAT2 YLAVPQ motívuma helyettesítette, akkor a TRESK csatorna aktivációs folyamat érzékenysége a citoplazma  $[Ca^{2+}]$  iránt fokozódott. A hTRESK-PVIVIT-YLAVPQ csatorna kisebb ionomycin koncentráció mellett elkezdett aktiválódni, mint a hTRESK-PVIVIT kontroll konstrukció (40. ábra). Nyilvánvaló ebből, hogy a kalcineurin nagyobb affinitással kötődik az YLAVPQ szekvenciához, mint a TRESK csatorna TLQLPP motívumához. A TRESK csatorna LxVP-szerű kötőhely kalcineurin iránti affinitás növelésének hatása tehát megnyilvánult a PVIVIT motívumot tartalmazó csatornában is, ami szintén amellett szól, hogy mindkét kalcineurin-kötőhely alapvető szerepet játszik a csatorna kalcium-függő szabályozásában.

### 5.10 A TRESK hurok régióhoz *in vitro* kötődik a 14-3-3 és a tubulin

A TRESK csatornafehérjéhez *in vitro* kötődő interakciós partnerek azonosítására affinitás kromatográfiás kísérletet végeztem egér agy citoszolból. A TRESKloop-His<sub>8</sub> csali fehérje az egér TRESK intracelluláris hurok régió egy részét, a 185-292 aminosavakat tartalmazta, C-terminális oktahisztidin címkével kiegészítve. A csali fehérjét denaturáló körülmények között (7 M urea) *E.coli* inklúziós testekből tisztítottuk (ld. *Módszerek* 4.5 fejezetet) és Ni-NTA rezinen immobilizálva, 1 ml-es oszlopba töltve használtuk a kísérletben [8].

Két egér agyból citoszolt készítettem (5 ml imidazolt (70 mM) tartalmazó foszfát pufferben) és átfolyattam egy 1 ml-es, csali fehérje nélküli Ni-NTA oszlopon (*N* jelű oszlop) ÄKTA-FPLC rendszer segítségével, majd az átfolyót azonnal felvittem arra az 1 ml-es oszlopra, amely a TRESKloop-His<sub>8</sub> csali fehérjét kötötte (*T* jelű oszlop). A két oszlopot innentől azonos körülmények között mostam, majd az erősen kötődő interakciós fehérjéket 7 M urea adásával eluáltam. Az *N* (kontroll) és *T* jelű oszlopkokról származó frakciókat egymás mellett analizáltam SDS-PAGE gélen, Coomassie kékkel festéssel (41. ábra, A panel). A legintenzívebb csíkokat kivágtam a gélből és tripszines emésztést

követő MALDI-TOF peptidfragmens tömegspektrometriás vizsgálattal, fizetett szolgáltatás keretében meghatároztam [8].



**41. ábra: A kalcineurin, a tubulin és a 14-3-3 adapter fehérje *in vitro* kötődik az egér TRESK intracelluláris hurok régióhoz**

**A.** A TRESK-loop-His<sub>8</sub> affinitás kromatográfia során kötődő egér agy fehérjéket 7 M ureával eluáltam. Az ábra a kontroll Ni-NTA rezin oszlopról származó (*N1-N3*), illetve a csalifehérjét tartalmazó oszlopról eluált (*T1-T3*) frakciók fehérjéit mutatja SDS-PAGE gélen, Coomassie kék festéssel. A *T2* frakcióban látható, de *N2* frakcióból hiányzó két intenzív csíkot tömegspektrometriával azonosítottuk, mint kalcineurin A alegység (1) és tubulin  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , illetve  $\alpha 1B$  vagy  $\alpha 1C$  alegységek keveréke (2). **B.** A Ni-NTA rezinen immobilizált TRESK-loop-His<sub>8</sub> fehérjét a kromatográfia előtt *in vitro* foszforiláltam protein kináz A (SIGMA) holoenzimmal cAMP jelenlétében. A foszforilált csalifehérje különböző 14-3-3 adapter fehérje izoformákkal lépett interakcióba, mint a 14-3-3 $\zeta$ , 14-3-3 $\gamma$  (3-as jelű csík) és a 14-3-3 $\epsilon$  (4-as jelű csík). A *P1* és *P2* sávok két független kísérlet eredményét mutatják. Módosítva a [8] közleményből.

Két intenzív csík jelent meg a *T1-T3* frakciókban, amelyek az *N1-N3* frakciókban nem vagy sokkal kisebb mennyiségben voltak megtalálhatók. A felső, kevésbé intenzív csík a kalcineurin A alegységnek felelt meg (1-es csík, 41.A ábra), amely korábbi eredményeinkkel jó egyezésben kötődött a TRESK intracelluláris hurok régióhoz. Az alatta lévő, jóval intenzívebb interakciós partner csík különböző tubulin izoformák keverékéből állt. A tripszines emésztéssel nyert peptidtömegek alapján egyértelműen azonosíthatók voltak a tubulin  $\beta 3$  és  $\beta 4$  alegységek, azonban a tubulin  $\alpha$  alegység peptidtömegek megfelelhetek az  $\alpha 1B$  vagy  $\alpha 1C$  izoformának is (amelyeket korábban Ma2 és Ma6 izoformának hívtak) [8]. Mivel az agyban az  $\alpha 1B$  (Ma2) a domináns izoforma, az  $\alpha 1C$  (Ma6) pedig csak nyomokban van jelen [286], ezért valószínű, hogy az  $\alpha 1B$  alegység szerepel a TRESK hurok tubulin kötésében.

A nagy mennyiségű tubulin retenciója a T oszlopon, a kontroll N oszlophoz képest, igazolta, hogy a tubulin a csalifehérjéhez asszociált és sokkal

kevésbé kötődött nem specifikusan a Ni-NTA resinhez. A tubulin csík jóval intenzívebb volt, mint az ismert interakciós partner kalcineuriné (41.A ábra). A kalcineurin és tubulin kötése a csalifehérjéhez fennmaradt a magas só koncentrációjú mosás közben is (15 ml térfogatú 50 mM és 2 M között futó lineáris NaCl gradiens, 0.5 ml/min). Ez arra utal, hogy a kötési mechanizmusukban a hidrofób kölcsönhatások jelentősek, amelyek csak a magas koncentrációjú ureás elúció közben oldódtak [8].

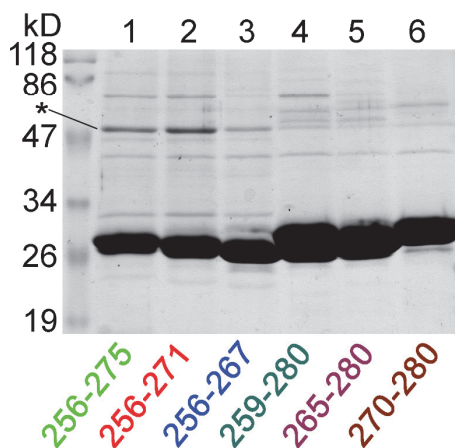
Egy másik kísérletben a protein kináz A (PKA) segítségével foszforiláltuk a TRESKloop-His<sub>8</sub> csalifehérjét és ezzel halásztunk interakciós partnereket egér agy citoszolból (41.B ábra). A PKA által foszforilált csalifehérjéhez különböző 14-3-3 adapter fehérje izoformák kötődtek. Az 14-3-3 $\epsilon$  izoforma (4-es csík, 41.B ábra) nagyobb molekulatömegű, mint a 14-3-3 $\zeta$  és 14-3-3 $\gamma$  (3-as csík), ezért a 14-3-3 $\epsilon$  lassabban vándorol az SDS-PAGE gélen. Számos további, kevésbé intenzív csík is látható a két független kísérletből származó *P1* és *P2* sávokban. A halvány csíkokat szintén meghatároztattuk tömegspektrometriával, azonban ezek a találatok többnyire nem specifikus interakciónak bizonyultak, mert mitochondriális, sejtmag és gardedám (chaperone) fehérjéket, illetve a (PKA preparátumból származó) szarvasmarha eredetű szennyező komponenseket kaptunk eredményül. Ebben a kísérletben is jelen voltak a kalcineurin és tubulin fehérjék a halvány csíkok között. Itt a tömegspektrometria a tubulin  $\beta$ 2C izoformát mutatta ki.

A kalcineurin mellett tehát a 14-3-3 és a tubulin kötődött a TRESK hurokhoz *in vitro*. A 14-3-3 kötés funkcionális jelentőségét a következő fejezetben tárgyalom. A tubulin *in vitro* kötésének jelentőségét nehéz megítélni. A tubulin az ún. szokásos gyanúsítottak ("usual suspects") közé tartozik a fehérje interakciós vizsgálatokban, mert nagy mennyiségben van jelen a citoszolban és gyakran nem specifikus módon kötődik a vizsgált fehérjéhez. Nagyban bonyolítja továbbá a tubulinnal kapcsolatos vizsgálatokat, hogy a tubulin fehérje *in vivo* több nagyságrendnyi méretbeli tartományban komplex módon szabályozott strukturális önszerveződést mutat, a monomer-dimer-oligomer-protofilamentum-mikrotubulus spektrumon. Számos különböző megközelítéssel próbáltam a TRESK *in vivo* funkcionális kapcsolatát vizsgálni a

mikrotubulus rendszerrel, vagy a tubulin dimerrel, de ezek a kísérletek nem vezettek eredményre. Úgy érzem azonban, hogy a kísérletek (pl. mikrotubulus rendszer farmakológiai manipulációja) túl általános és leegyszerűsítő megközelítést jelentettek és nem voltak eléggé kiélezve a probléma vizsgálatára. Mindemellett, teljesen alkalmatlanok voltak az interakció lehetőségének kizárására. Emiatt nem is írok róluk többet itt. A TRESK és tubulin *in vivo* interakcióját tehát jelenleg sem bizonyítani, sem cáfolni nem tudom.

Habár az interakció *in vivo* jelentősége kérdéses marad, a tubulin kötődése a TRESK hurok régióhoz *in vitro* minden kísérletben jól reprodukálható volt. Nemcsak az affinitás kromatográfiás rendszerben jelentkezett (41.A ábra), hanem egyszerű "pulldown" reakciókban is kifejezetten megnyilvánult (ld. pl. a 38. ábra A, B, C és F paneleket). Ez lehetővé tette annak a kérdésnek a megválaszolását, hogy a TRESK intracelluláris hurkon belül melyik terület felelős főként a tubulin kötésért. Az intracelluláris hurok részeiből készült GST fúziós fehérjékkel "pulldown" kísérletekben leszűkítettük a kötést mutató területet, lépésenként haladva. Végül egy 16 aminosavból álló területet azonosítottunk, amely még erősen kötötte a tubulint (42. ábra) [8].

256 LVLGRLSYSIISNLDEVGQQVERLD 280  
 256 LVLGRLSYSIISNLDEVGQQ 275  
 256 LVLGRLSYSIISNLDE 271  
 256 LVLGRLSYSIIS 267  
 259 GRLSYSIISNLDEVGQQVERLD 280  
 265 IISNLDEVGQQVERLD 280  
 270 DEVGQQVERLD 280



#### 42. ábra: A humán TRESK 256-271 aminosavak elegendők a tubulin kötés kialakításához

A felső sorban a humán TRESK aminosav szekvenciája látható a 256-280 régióban (fekete). Alatta a csalifehérjékben GST-hez fuzionált peptidszekvenciákat ábrázoltam színesen. Alattuk a csalifehérjékkel (ld. a színes feliratokat alul) egér agy citoszolból végzett "pulldown" kísérletek eredménye látható SDS-PAGE gélen futtatva, Coomassie kék festéssel. A tubulint *csillaggal* jelöltem. A 256-280 és 256-271 fragmensek (1. és 2. sáv) erősen kötötték a tubulint, a 256-267 peptid (3. sáv) viszont kevésbé. Az N-terminálison csonkolt peptidok a nem specifikus háttérnek megfelelő tubulin kötést adtak (4.-6. sáv). Módosítva a [8] közleményből.

A tubulin kötésért elsősorban felelős régió magába foglalja a szerin klaszter RLSYSIIS aminosavait és a megelőző LVL hidrofób szekvenciát, illetve az utánuk következő NLDE negatív töltésű területet. Úgy tűnik, hogy az LVL és az NLDE eltávolítása jelentős mértékben csökkenti az interakciót a tubulinnal. Az *in vitro* tubulin kötés tehát a csatorna aktivitás foszforiláció-függő szabályozásában legfontosabb területen jön létre. Jelenleg nem világos, hogy ez csupán véletlen egybeesés vagy a tubulin kötésnek szerepe van a csatorna aktivitás szabályozásában [8].

A TRESK tubulin kötésének vizsgálatához nagyon hasonló utat járt be egy másik munkacsoport a P2X<sub>2</sub> purinerg receptor ioncsatorna tanulmányozása kapcsán [287]. Szintén *in vitro* GST fúziós fehérje kötési vizsgálatokkal azt találták, hogy a P2X<sub>2</sub> receptor C-terminális régiója köti a tubulint, de a P2X<sub>5</sub> és P2X<sub>7</sub> receptorok intracelluláris része nem. A tubulin kötésért felelős területet ők is leszűkítették, egy 42 aminosavból álló szakaszra. Azt vettem észre, hogy ennek a szakasznak a közepén megtalálható az LVLGQI szekvencia, amely jól megfelel az általunk azonosított 16 aminosavból álló kötőhelyben található LVLGRL régiónak. Valószínű, hogy a TRESK és P2X<sub>2</sub> receptor *in vitro* tubulin kötésének mechanizmusa hasonló [8].

### 5.11 A 14-3-3 adapter fehérje részt vesz a TRESK szabályozásában

A TRESK csatorna többféle konzervált szabályozó motívumot is tartalmaz az intracelluláris hurok régiójában. A fent részletesen tárgyalt kalcineurin-kötő PxlIT motívum konzervált az emlős fajokban, de nem található meg az ez alatti rendszertani kategóriákban, mint pl. a halak vagy a madarak. Megklónoztuk a TRESK csatornát csirkéből (*Gallus gallus*) és zebrahalból (*Danio rerio*). Ezek a csatornák, annak megfelelően, hogy nem tartalmazzák a PxlIT motívumot, nem aktiválódnak a citoplazma [Ca<sup>2+</sup>] növelésére a *Xenopus* expressziós rendszerben (*nem mutatom az adatokat*).

Szemben a PxlIT motívummal, egy I. típusú (mode I) 14-3-3 adapter fehérje kötőhely erősen konzervált minden faj TRESK csatornájának intracelluláris hurok régiójában (43. ábra) [288]. (A halaktól alacsonyabb rendű élőlényekben eddig nem tudtam a TRESK csatorna őst megtalálni.)

| Kalcineurin-kötő motívum |           |     | 14-3-3-kötő motívum |            |     |
|--------------------------|-----------|-----|---------------------|------------|-----|
| Konszenzus               | XXPXIXITX |     | Konszenzus          | XRSXSXPXX  |     |
| Humán*                   | AVPQIIISA | 206 | Humán***            | ERSNSCPDL  | 256 |
| Makákó                   | AVPQIIIGA | 205 | Selyemmajom         | ERSSSCPDL  | 255 |
| Selyemmajom              | AIPQIIINA | 205 | Kutya               | QRSNSCPDL  | 253 |
| Egér**                   | AIPQIVIDA | 216 | Ló                  | ERSTSCPDL  | 254 |
| Kutya                    | AVPRIVIDA | 203 | Kacsacs. eml.       | ERCNSCPDL  | 213 |
| Panda                    | AVPRIIIDA | 203 | Csirke              | ERWSSCPDL  | 210 |
| Ló                       | AVPRISISA | 204 | Xenopus             | QKSEFSCPDL | 295 |
| (hNFATc1)                | ESPRIEITS | 124 | Zebrahal            | SKSCSCPDL  | 262 |

#### 43. ábra: A kalcineurin-kötő és 14-3-3-kötő motívum összehasonlítása különböző fajokban

A kalcineurin-kötő motívum konzervált az emlős fajokban (*bal szekvencia összehasonlító táblázat*). (\* a humán, orangután és csimpánz, illetve \*\* az egér és patkány aminosav szekvenciák megegyeznek egymással ezen a területen). Legalul a humán NFAT transzkripció faktor c1 izoforma (NFAT2) kalcineurin-kötő motívumának szekvenciáját tüntettem fel (*hNFATc1*). A 14-3-3-kötő motívum konzervált a gerinces fajokban (*jobb szekvencia összehasonlító táblázat*). (\*\*\*) a humán, orangután, csimpánz, makákó, panda, patkány és egér 14-3-3-kötő motívumok aminosav szekvenciája megegyezik.) A humán, egér, csirke és zebrahal TRESK ortológok cDNS-ét megklónoztuk, a többi szekvenciát letöltöttük a génbank adatbázisból (NCBI GenBank). (*Kacsacs. eml.*: kacsacsőrű emlős.) Módosítva a [288] közleményből.

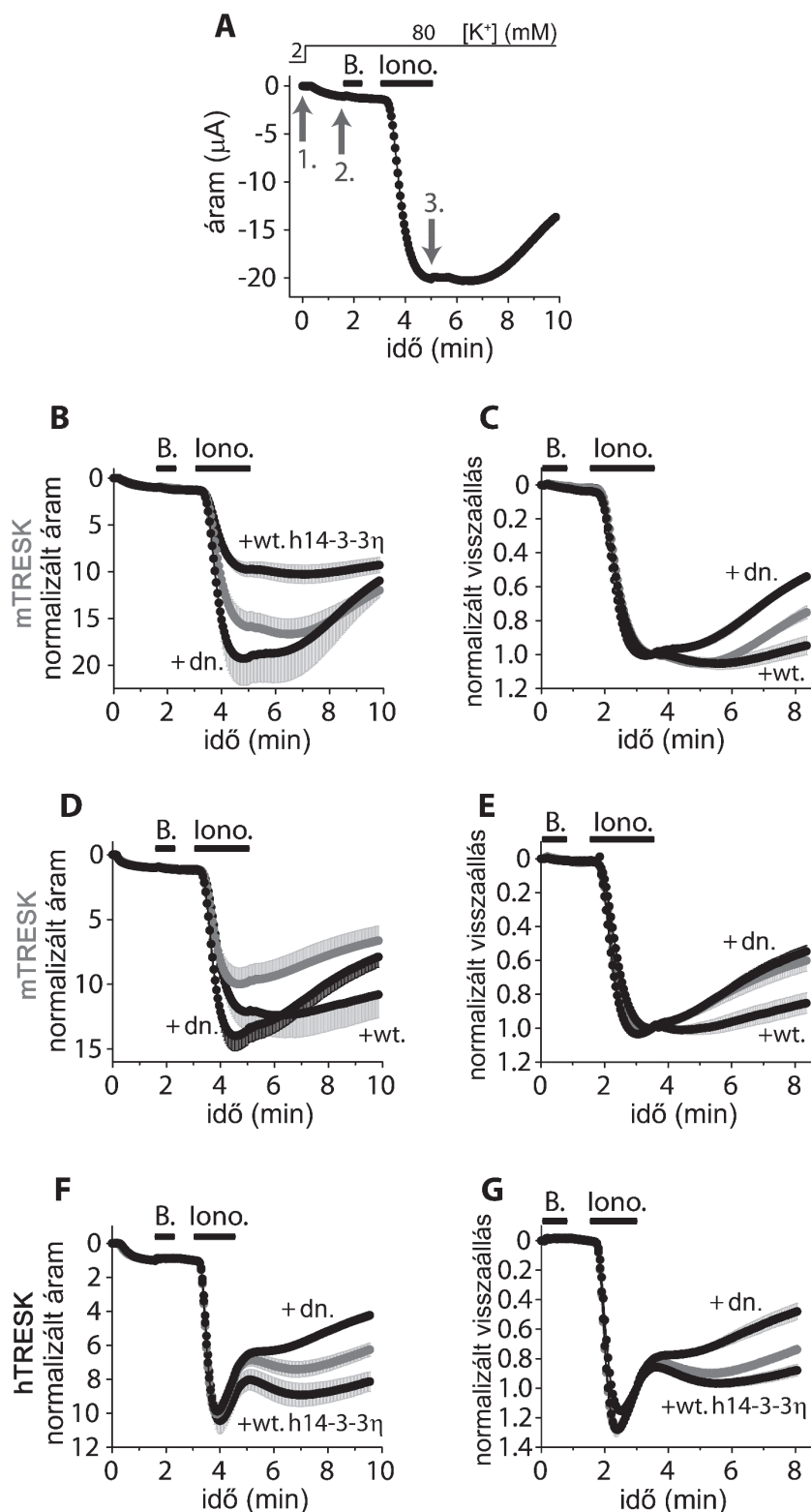
A TRESK csatorna tehát a gerincesek kezdeti evolúciója óta létezik és benne a 14-3-3-kötőhely ugyanabban a pozícióban lényegében változatlanul fennmaradt az elmúlt kb. 400 millió évben. Nyilvánvalóan következik ebből, hogy a 14-3-3 kapcsolódása a csatornához alapvető, a kalcium-függő szabályozásnál is ősből szerepet tölt be a TRESK működésében. A TRESK interakciója a 14-3-3 fehérjével lényegesen eltér a TASK-1 és TASK-3 csatornák 14-3-3-kötésétől (ld. a *Bevezetés* 2.1.5 fejezetét és a 10. ábrát). A TASK csatornában a 14-3-3 a C-terminális utolsó aminosavaihoz kötődik, amelyek egy atípusos (mode III) 14-3-3-kötőhelynek felelnek meg, és az interakció elősegíti a TASK csatornák kihelyeződését a plazmamembránba [101-104]. Ezzel ellentétben, a TRESK konzervált 14-3-3-kötőhelye nem a C-terminálisban, hanem az intracelluláris hurok régióban található és egy konvencionális I. típusú (mode I) kötőhelyet alkot, amely tökéletesen követi a konszenzus motívum szabályait (43. ábra).

A 14-3-3 adapter fehérje ubikviter az eukarióták citoplazmájában. Kötődik több száz ismert interakciós partner fehérje szerin tartalmú konszenzus kötőszekvenciájához, a szerin foszforilációjától függő módon, és nagyon sokféle

sejtbiológiai folyamat szabályozásához hozzájárul [289-293]. A 14-3-3 két alegységből áll és a dimer mindkét komponense tartalmaz egy kötőhelyet a foszforilált konszenzus motívum számára. Ez a felépítés természetesen rögtön felveti a lehetőségét, hogy egy 14-3-3 fehérje két kötőhelyével a TRESK alegységek dimerében található két konszenzus helyhez egyszerre kötődhet. Alternatív hipotézisként, az egyik kötőhelyével csatornához kihorgonyzott 14-3-3 a másik kötőhelyével regulátor fehérjét rögzíthet. Mindazonáltal a TRESK csatorna 14-3-3-kötésének sztöchiometriája, illetve a 14-3-3 adapteren keresztül a TRESK-hez kihorgonyzódó regulátor fehérje jelenleg nem ismert.

A 14-3-3 adapter fehérje TRESK csatornára gyakorolt hatását vad típusú és domináns negatív 14-3-3 konstrukciók koexpressziójával kezdtem vizsgálni. A domináns negatív, R57,61A mutáns 14-3-3 $\eta$  a foszforilált konszenzus kötőhelyhez kapcsolódásban fontos pozitív töltésű arginineket nem tartalmazza [294]. Az ilyen típusú domináns negatív konstrukciókat rendkívül kiterjedten használták korábban az endogén 14-3-3 funkció eredményes kivédésére a legkülönbözőbb biológiai rendszerekben, habár a domináns negatív hatás mechanizmusa nem pontosan tisztázott. A feltételezett hatásmechanizmus az, hogy a mutáns 14-3-3 inaktív heterodimereket képez a vad típusú alegységekkel [295,296].

A koexpressziós kísérletekben általában három petesejt csoportot mértem. Az egyik csoportban a sejtek csak a TRESK csatornát fejezték ki, a másokban koexpresszálták a vad típusú 14-3-3-at (wt14-3-3) a csatornával, a harmadikban pedig az R57,61A mutáns domináns negatív 14-3-3 konstrukciót (dn14-3-3) koexpresszálták a TRESK-kel. A kezdeti mérésekből kiderült, hogy a 14-3-3 meglehetősen összetett hatást fejt ki. Ráadásul úgy tűnt, hogy az endogén 14-3-3 expresszió ingadozó az egyes petesejt preparátumokban (a csak csatornát kifejező sejtek tulajdonságai hol a wt14-3-3, hol a dn14-3-3 koexpresszááló csoporthoz hasonlítanak). Emiatt, egy idő után, már csak a wt14-3-3 és dn14-3-3 csoportok eredményét hasonlítottam össze statisztikailag és a csatornát önmagában kifejező sejtek adatait tájékoztatásul adtam meg (44. ábra) [5].



**44. ábra: A vad típusú 14-3-3 $\eta$  koexpressziója a TRESK csatornával gátolja, a domináns negatív 14-3-3 $\eta$  koexpressziója viszont gyorsítja a háttér K<sup>+</sup> áram visszaállását a kalcium-függő aktiváció után**

**A.** A mérési protokollt ismertetem egér TRESK csatornát kifejező petesejt reprezentatív áram regisztrátumán. A háttér K<sup>+</sup> áramot -100 mV-on, a 21.B ábrán bemutatott módszerrel mértem. A mérés kezdetén, miután az EC [K<sup>+</sup>]-ot 2-ről 80 mM-ra növeltem,

rövid benzocain (*B.*, 1 mM) adással meggyőződtem arról, hogy a vizsgált sejtben a TRESK csatornák tényleg nyugalmi állapotban vannak. Ezután a csatornákat ionomycinnel (0.5  $\mu$ M) aktiváltam, majd az ionomycin elvonását követően hosszan mértem az áram visszatérési kinetikáját a nyugalmi gátolt állapot irányába, 80 mM EC [ $K^+$ ] jelenlétében. A "normalizált áram" származtatott mennyiséget úgy számítottam, hogy a 2 mM EC [ $K^+$ ]-ban mért áramot normalizáltam 0-ra (1. *szürke nyíl*) és 80 mM EC [ $K^+$ ]-ban mértet (2. *szürke nyíl*) pedig 1-re. A "normalizált visszaállás" számításánál az ionomycin előtti áramot (2. *szürke nyíl*) normalizáltam 0-ra, az ionomycin utánit (3. *szürke nyíl*) pedig 1-re. **B és C.** Normalizált áramokat és visszaállásokat számítottam három petesejt csoportban mért áramokból, amelyek közül az egyik az egér TRESK csatornát expresszáta (*szürke görbe*), a másik koexpresszáta a csatornát a vad típusú 14-3-3 $\eta$  adapter fehérjével (*wt.*), a harmadik pedig a domináns negatív (R57,61A mutáns) 14-3-3 $\eta$  konstrukcióval (*dn.*) ( $n=3\times 5$ ). **D és E.** A B és C paneleken bemutatott mérést megismételtem egy másik petepreparátumban ( $n=3\times 6$ ). **F és G.** A B és C paneleken bemutatott mérést elvégeztem a humán TRESK csatornával is (5-7 petesejt csoportonként). Az ionomycin kalciumtól független gátló hatása erősebbnek tűnt a humán TRESK csatornára, mint az egér ortológusra. A *szürke sávok* a szórást mutatják. Módosítva az [5] közleményből.

---

A vad típusú és domináns negatív 14-3-3 koexpressziója nem változtatta a bazális TRESK áramot jelentős mértékben, szisztematikus módon, a különböző petesejt preparátumokban (*az adatokat nem mutatom*). Ezért úgy tűnt, hogy a 14-3-3 nem fejt ki olyan szembeötlő hatást a TRESK csatorna plazmamembrán expressziójára, mint a TASK csatornák esetében. Megvizsgáltam, hogy a 14-3-3 hogyan befolyásolja a kalcium-függő TRESK szabályozást. Egyes petesejt preparátumokban a domináns negatív 14-3-3 koexpresszió szignifikánsan növelte az egér TRESK relatív aktivációjának mértékét a vad típusú 14-3-3 fehérjét koexpresszáló csoporthoz képest. Az ionomycinnel végzett ingerlés végén a  $K^+$  áram  $19.1 \pm 2.8$ -szorosra ( $n=5$ ) növekedett a dn14-3-3 csoportban, viszont csak  $9.4 \pm 0.7$ -szeresre ( $n=5$ ) a wt14-3-3 csoportban ( $p<0.02$ , Student t-teszt, 44.B ábra). Ez a hatás azonban csak egyes petesejt preparátumokban jelentkezett (pl. nem jött létre a 44.D ábrán bemutatott mérésben) és nem alakult ki a humán TRESK csatornával végzett mérés során (44.F ábra). Az egér TRESK csatorna esetén viszont reprodukálható volt a dn14-3-3 aktivációt fokozó hatása, a wt14-3-3-hoz képest, a rekombináns 14-3-3 fehérje mikroinjektációs kísérletekben (ld. alább).

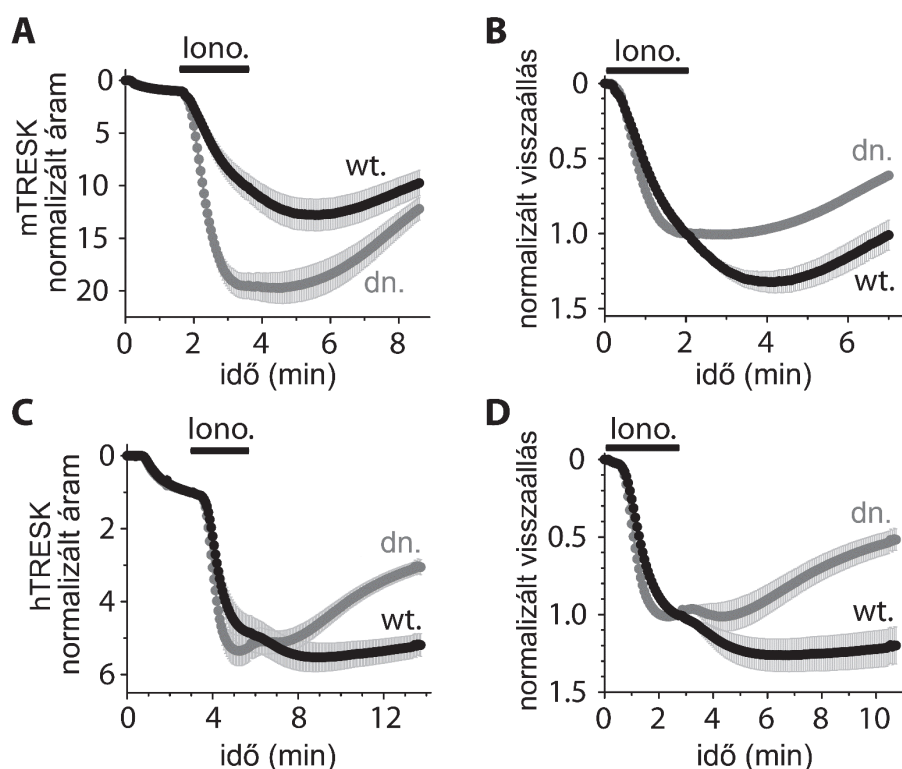
Amíg a relatív aktiváció nagyságára kifejtett hatás faj és petepreparátum függést mutatott, addig az aktivált áram nyugalmi állapotba visszatérését a 14-3-3 minden kísérletben ugyanúgy befolyásolta. A wt14-3-3 koexpresszió

lassította az áram visszatérését a kiindulási gátolt állapotba, a dn14-3-3 koexpresszió estében mérhető nagyobb visszaállási sebességhez képest. Az egyik, egér csatornával végzett kísérletben, a wt14-3-3 koexpresszálo csoportban, a visszaállás  $5 \pm 6$  % volt a mérés végén (gyakorlatilag nem csökkent az áram az ionomycin elvonását követő négy percben, n=5, 44.C ábra). A dn14-3-3 koexpresszálo csoportban viszont  $46 \pm 1$  % volt a "normalizált visszaállás" (vagyis az ionomycin általi aktiváció kb. fele már megszűnt a mérés végére, 44.C ábra, n=5,  $p < 10^{-4}$ , Student t-teszt). A másik petepreparátumban, egér TRESK csatornával végzett kísérletben, a wt14-3-3 csoportban  $15 \pm 6$  %, a dn14-3-3 csoportban pedig  $46 \pm 1$  % volt a normalizált visszaállás (44.E ábra, n=2×6,  $p < 0.003$ ). A 14-3-3 a humán TRESK visszaállásra is kifejtette a hatását, a wt14-3-3 csoportban  $12 \pm 4$  %, a dn14-3-3 csoportban pedig  $52 \pm 6$  % visszaállás jött létre (44.G ábra, n=2×7,  $p < 0.002$ ). Összességében elmondható tehát, hogy a 14-3-3 gátolja a TRESK csatorna áramának visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően [5].

A koexpressziós kísérletekben a vad típusú vagy domináns negatív 14-3-3 napokig jelen volt a citoplazmában a mérést megelőzően, komplex sejtbioológiai folyamatokat, akár génexpressziós szinteket is módosíthatott. Vizsgálni szerettem volna, hogy a 14-3-3 ennél rövidebb idő alatt is kifejti-e a TRESK csatornára a hatásait, ezért rekombináns 14-3-3 fehérjét mikroinjektáltam az oocytákba mérés előtt. A konstitutívan aktív kalcineurin fehérje mikroinjektálással végzett TRESK aktivációs kísérletekből tudtam, hogy az injektált fehérje mintegy 2-3 óra alatt hozza létre hatását, valószínűleg ennyi időre van szükség az elkeveredéshez a citoplazmában. Tehát a fehérje mikroinjektációs kísérletekben a 14-3-3 hatását is ebben az időtartományban vizsgálhattam.

Ebben a kísérletben olyan petesejteket mikroinjektáltam különböző GST-14-3-3 fúziós fehérjékkel, amelyek az egér TRESK csatornával koexpresszálták a domináns negatív (R57A,R61A) 14-3-3 $\eta$ -t, az endogén 14-3-3 funkció elnyomására. A két összehasonlított csoport abban különbözött, hogy az egyikben a sejteket a vad típusú 14-3-3 szekvenciát tartalmazó GST-14-3-3 $\eta$

fehérjével injektáltam (wt14-3-3 (wt.) csoport), a másikon pedig a domináns negatív R57A,R61A mutáns 14-3-3 szekvenciát tartalmazó GST fúziós fehérjével (dn14-3-3 (dn.) csoport). Az egér TRESK ionomycin hatására létrejövő aktivációja kisebb volt a vad típusú GST-14-3-3 $\eta$ -val injektált csoportban ( $10.1 \pm 1.3$ -szerez aktiváció az ionomycin elvonásakor,  $n=6$ , wt. görbe), mint a domináns negatív mutációt hordozó fúziós fehérjével injektált sejtekben ( $19.5 \pm 1.2$ -szerez,  $n=5$ ,  $p<0.001$ , dn. görbe, 45.A ábra).



**45. ábra: A rekombináns GST-14-3-3 $\eta$  fehérje mikroinjektálása gátolja az egér TRESK csatorna kalcium-függő aktivációját, emellett a humán és egér csatornák esetében is késlelteti az áram aktiváció utáni visszaállását a nyugalmi állapotba**

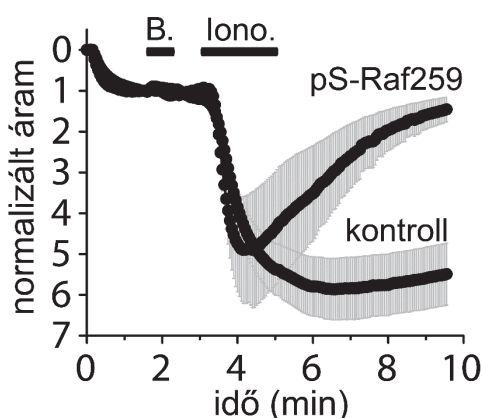
**A és B.** Normalizált áramokat és visszaállásokat számítottam két petesejt csoportban mért áramokból, amelyek közül az egyikben a sejteket 50 nl GST-14-3-3 $\eta$ -val (fekete wt. görbe,  $n=6$ ), a másikon pedig 50 nl R57A,R61A mutáns domináns negatív GST-14-3-3 $\eta$  fehérjével (szürke dn. görbe,  $n=5$ ) mikroinjektáltam. Az oocyták az egér TRESK csatornával koexpresszálták az R57A,R61A mutáns 14-3-3 $\eta$ -t (mindkét csoportban). Az ionomycint (lono., 0.5  $\mu$ M) 108-248 perccel a fúziós fehérje mikroinjektálás után adtam. A mérést és adatkiértékelést a 44. ábrán bemutatotthoz hasonlóan végeztem. **C és D.** A B és C paneleken bemutatott mérést elvégeztem a humán TRESK csatornával is ( $n=11$  a wt. és  $n=12$  a dn. GST-14-3-3 $\eta$  csoportban). A fehérjéket 188-236 perccel az ionomycin előtt mikroinjektáltam. Módosítva az [5] közleményből.

Az ionomycin elvonást követően az egér TRESK áram visszatérése a nyugalmi állapotba szintén különbözött a két csoportban. A wt14-3-3 mikroinjektált csoportban az áram az ionofór kimosását követően egy ideig még tovább nőtt és erről a szintről kb. ugyanoda tért vissza mérés végére, mint ahonnan az ionomycin kimosás kezdetekor elindult ( $1 \pm 10$  % normalizált visszaállás,  $n=6$ ). Ezzel szemben a dn14-3-3 injektált sejtekben a normalizált visszaállás nagyobb mértékű volt a mérés végén ( $41 \pm 2$  %,  $n=5$ ,  $p<0.01$ , 45.B ábra). Ugyanezt a fehérje mikroinjektációs kísérletet megismételtem csak egér TRESK csatornát kifejező sejtekkel (vagyis dn14-3-3 koexpresszió nélkül) és a vad típusú GST-14-3-3 $\eta$  injektálás ezekben a sejtekben is szignifikánsan csökkentette a kalcium-függő aktiváció nagyságát és az áram visszaállási sebességét (*az adatokat nem mutatom*).

Ha a humán TRESK csatornán teszteltem a vad típusú és domináns negatív 14-3-3 fehérje mikroinjektálás hatását, akkor a háttér  $K^+$  áram relatív aktivációjának mértéke nem különbözött a kétféle fehérjével injektált csoportban (45.C ábra, a petesejtek ebben a kísérletben is koexpresszálták a dn14-3-3-at a csatornával az endogén 14-3-3 működésének csökkentésére). Ezzel szemben az áram visszaállások a humán TRESK esetében is egyértelműen különböztek a wt14-3-3 ( $-20 \pm 12$  %,  $n=11$ ) és dn14-3-3-mal injektált ( $48 \pm 7$  %,  $n=12$ ) csoportokban ( $p<10^{-4}$ , 45.D ábra; a negatív normalizált visszaállás a wt14-3-3 csoportban azt jelenti, hogy a mérés végén az áram még nagyobb volt, mint az ionomycin kimosás kezdetén). Összefoglalva tehát, a GST-14-3-3 $\eta$  fehérje mikroinjektálása csökkentette a humán és egér TRESK áram visszaállását, de csak az egér TRESK aktivációját gátolta. A fehérje mikroinjektálással kapott eredmények tehát tökéletesen megfeleltek a koexpressziós kísérletekből levont következtetéseknek [5].

További kísérleti megközelítést terveztem, amellyel a 14-3-3 hatásának gyors reverzibilitása igazolhatóvá vált. Erőteljes és fenntartott áram visszaállás gátló hatást hoztam létre az egér TRESK csatorna és a vad típusú 14-3-3 $\eta$  adapter fehérje koexpressziójával. A sejtek egy csoportját mikroinjektáltam pS-Raf259 foszfopeptiddel (LSQRQRSTSTPNVHA, a 14-3-3-kötő motívumot aláhúzás jelöli, a duplán aláhúzott szerin foszforilált), amely nagy affinitással

kötődik a 14-3-3 peptidkötő árkaiba [297,298], a sejtek másik (kontroll) csoportját pedig vízzel injektáltam. A vízzel mikroinjektált kontroll sejtekhez képest, a pS-Raf259 foszfopeptiddel injektált sejtekben a TRESK áram ionomycin utáni visszaállása drámai módon felgyorsult. Amíg a vízzel injektált sejtekben a normalizált visszaállítás  $1 \pm 11$  %-nak adódott ( $n=6$ , nincs visszaállítás a mérés végén), addig pS-Raf259 csoportban a mérés végére a TRESK áram megközelítette a nyugalmi értéket ( $88 \pm 14$  % visszaállítás,  $n=6$ ,  $p<0.001$ , 46. ábra) [5].

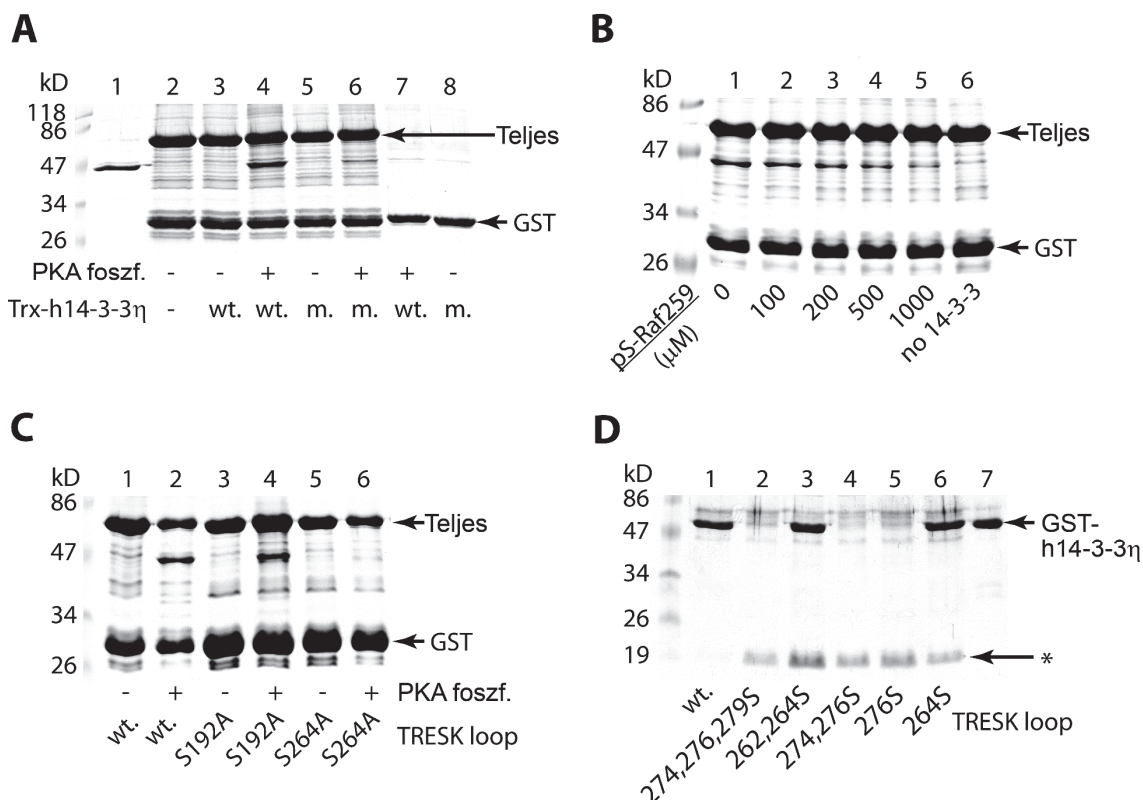


**46. ábra: A pS-Raf259 foszfopeptid mikroinjektálása felgyorsítja a TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően**

Az egér TRESK csatornát és 14-3-3 $\eta$  fehérjét koexpresszáló petesejtekben az ionomycin utáni áram visszaállítás kinetikáját mértem pS-Raf259 foszfopeptid vagy víz (kontroll) mikroinjektálást követően ( $n=2 \times 6$ ). Az ionomycint 37-112 perccel a pS-Raf259 (50 nl, 10 mM) injektálás után adtam. A mérési módszert a 44. ábrán ismertettem. Módosítva az [5] közleményből.

Így tehát az endogén és túlexpresszált 14-3-3 fehérjék peptidkötő árkaik telítése pS-Raf259 foszfopeptiddel kivédte a 14-3-3 által kifejtett TRESK áram visszaállítás gátló hatást. Ez azt mutatja, hogy a 14-3-3 TRESK áram visszaállásra kifejtett hatása aránylag gyorsan visszafordítható és a hatás nem a csatorna környezetének hosszútávú közvetett (pl. génexpresszió változás miatti) átrendeződésén alapul [5].

A 14-3-3 funkcionális hatásainak vizsgálatán kívül szerettem volna megbizonyosodni arról, hogy a TRESK csatorna minden fajban erősen konzervált, jóslott 14-3-3-kötőszekvenciája tényleg foszforiláció-függő módon köti az adapter fehérjét. Ezért "pulldown" kísérletet végeztünk glutation rezinen immobilizált GST-TRESKloop-TAPtag csalifehérjével (egér TRESK 164-292 aminosavak) és a Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$  (thioredoxin-oktahisztidin humán 14-3-3 $\eta$  fúziós fehérje) interakcióját vizsgáltuk. A GST-TRESKloop-TAPtag csak akkor kötötte a Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$ -t, ha a csalifehérjét előzőleg foszforiláltuk protein kináz A (PKA) enzimmel (47. ábra, A panel, 3. vs. 4. sáv) [5].



#### 47. ábra: Az RSNSCP motívum köti a 14-3-3 fehérjét

**A.** Az ábrán GST "pulldown" kísérlet látható a GST-TRESKloop-TAPtag vagy GST (kontroll) csalféhejével, PKA-val foszforilálás után vagy anélkül, a Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$  fehérje vad típusú (wt.) vagy R57A,R61A mutáns (m.) változatának jelenlétében vagy hiányában, ahogy a gél alatti jelölések mutatják. Az 1. sávban csak Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$ , a 2.-ban pedig csak GST-TRESKloop-TAPtag csalféhejét futtattunk. A "Teljes" felirat a GST-TRESKloop-TAPtag fehérjét, a "GST" pedig egy részlegesen átíródott vagy bomlott szennyező fehérjét jelez. A 7. és 8. sávban kontroll, GST-vel végzett reakciók láthatók. **B.** A Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$  kötést a PKA által foszforilált GST-TRESKloop-TAPtag fehérjéhez különböző koncentrációjú pS-Raf259 peptid jelenlétében vizsgáltuk (a koncentrációkat a gél alatt megadtuk). A 6. sávban nem adtunk Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$  fehérjét a reakcióhoz. **C.** A Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$  kötést vad típusú, S192A vagy S264A mutáns GST-TRESKloop-TAPtag csalféhejével vizsgáltuk, a csalféheje PKA-val foszforilálása után vagy anélkül (ahogy a gél alatti jelölések mutatják). **D.** His<sub>8</sub> "pulldown" kísérlet a Ni-NTA rezinen immobilizált, előzőleg PKA-val foszforilált, vad típusú, vagy különböző mutáns TRESKloop-His<sub>8</sub> csalféhejéssel, GST-h14-3-3 $\eta$  jelenlétében. A csalféhejék csak a gél alatt megjelölt szerineket tartalmazták, a többi szerint és treonint alaninra cseréltük bennük. A csalféhejék mérettartományát *csillag* jelöli, a vad típusú csalféheje kevésbé festődött Coomassie kékkel. A 7. sávban csak GST-h14-3-3 $\eta$  fehérjét futtattunk. Minden panelen Coomassie kékkel festett SDS-PAGE géleket látunk. Módosítva az [5] közleményből.

A PKA-val foszforilált GST-TRESKloop-TAPtag viszont csak sokkal kevésbé kötötte az R57A,R61A mutáns Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$ -t (5. vs. 6. sáv), mint a vad típusút (4. sáv). Kísérleti körülményeink között a 14-3-3 nem specifikus kötődése a GST fehérjéhez (és glutation agarózhoz) elhanyagolható volt (7. és

8. sáv, 47.A ábra). A pS-Raf259 foszfopeptid koncentráció-függő módon visszaszorította a PKA-val foszforilált GST-TRESKloop-TAPtag és Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$  interakcióját (47.B ábra), ami igazolja, hogy a két fehérje kölcsönhatása a 14-3-3 peptidkötő árkainak közreműködésével valósul meg [5].

Az egér TRESK hurok régió az erősen konzervált RSNSCP<sup>266</sup> motívumon kívül tartalmaz még egy KWRSLP<sup>194</sup> szekvenciát, amely esetleg szintén megfelelhet 14-3-3 kötőhelynek. A megfelelő szerinek alaninra cserélésével megvizsgáltuk, hogy a 14-3-3-kötés melyik motívumon keresztül jön létre. Az S192A mutáns GST-TRESKloop-TAPtag hasonlóan kötötte a Trx-His<sub>6</sub>-h14-3-3 $\eta$  fehérjét, mint a vad típusú 14-3-3 kötőhellyel rendelkező fúziós fehérje (2. vs. 4. sáv, 47.C ábra), azonban az S264A mutáció megszüntette a 14-3-3-kötést (6. sáv, 47.C ábra). A 14-3-3 kötés tehát a TRESK csatorna RSNSCP motívumán keresztül jött létre [5].

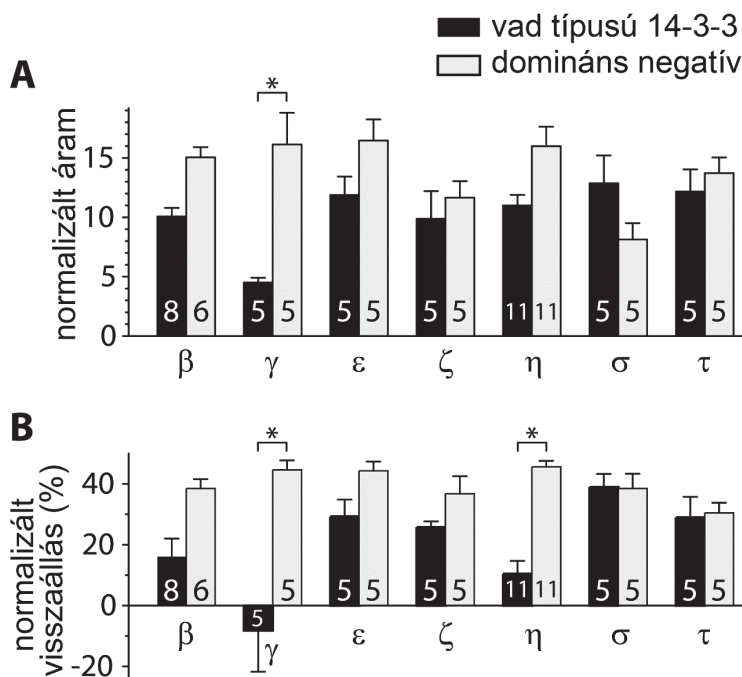
A kísérletet elvégeztük felcserélt fúziós fehérje "címkézéssel" is, a TRESKloop-His<sub>8</sub> csalifehérje felhasználásával, amely az egér TRESK 185-292 aminosavait tartalmazta, köztük tíz szerint és egy treonint. A Ni-NTA rezinen immobilizált, PKA-val foszforilált, TRESKloop-His<sub>8</sub> kötötte a GST-h14-3-3 $\eta$  fúziós fehérjét (47.D ábra, 1. sáv). Ha a csalifehérje olyan változatait használtuk, amelyekben a vizsgált szerinek kivételével minden egyéb szerint és treonint alaninra cseréltünk, akkor ezekből a kísérletekből azt kaptuk, hogy azok a konstrukciók kötötték a 14-3-3-at, amelyekben a S264 aminosav megtartott volt (2.-6. sáv, 47.D ábra).

Nem kötötték tehát a 14-3-3-at azok a konstrukciók, amelyekben csak a szerin klaszter (S274, 276 és 279) szerin aminosavai voltak jelen (2., 4. és 5. sáv). Jól kötötte viszont a GST-h14-3-3 $\eta$ -t például az a TRESKloop-His<sub>8</sub> konstrukció, amelyben egyedül a S264 volt megtartott (6. sáv, 47.D ábra). Ez a kísérlet is megerősítette tehát, hogy az RSNSCP motívum és benne a S264 (aláhúzott) aminosav kötőhelyet képez a 14-3-3 adapter fehérje számára [5].

Nem következik viszont a fenti kísérletekből egyértelműen, hogy a TRESK csatorna nem tartalmaz az RSNSCP motívumon kívül másik 14-3-3 kötőhelyet. Előfordulhat ugyanis, hogy a másik (feltételezett) 14-3-3 kötőhely szerin determináns aminosavát nem foszforilálja a PKA és ezért annak a

kötőhelynek a foszforiláció-függő működését nem lehet a fent használt kísérleti protokollal kiváltani. Nem lehet tehát kizárni pl. a szerin klaszter 14-3-3-kötését (a szerin klasztert a PKA nem vagy kevéssé foszforilálja, ld. a következő fejezetben), habár ez a régió nem felel meg szabályos 14-3-3-kötő konszenzus motívumnak. Szintén nem zárható ki a KWRSLP<sup>194</sup> motívum 14-3-3 kötése, hiszen nem vizsgáltuk a PKA általi S192 foszforilálódást.

A fenti kísérletekben minden esetben a humán 14-3-3 $\eta$  izoformával dolgoztunk. A 14-3-3-nak azonban számos izoformája van és ezek funkciója nem ekvivalens. A 14-3-3-függő TRESK szabályozás izoforma-specifititásának vizsgálatához megklónoztam RT-PCR módszerrel az összes további 14-3-3 izoformát egérből, majd ezek vad típusú és domináns negatív változatának hatását megmértem a TRESK csatorna kalcium-függő aktivációjára (48. ábra).



**48. ábra: A különböző 14-3-3 izoformák koexpressziójának hatása az egér TRESK kalcium-függő szabályozására**

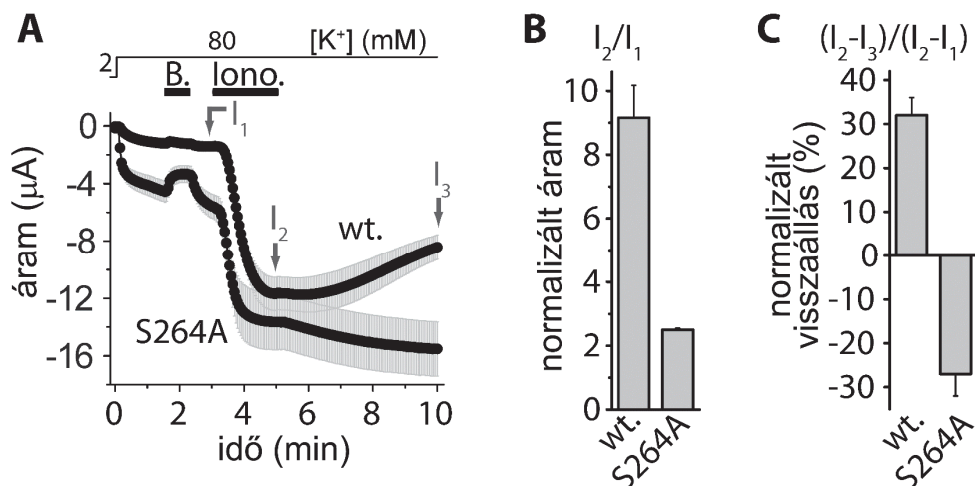
**A.** Ionomycin (0.5  $\mu$ M) hatására létrejövő normalizált aktiváció olyan petesejtekben, amelyek koexpresszálták a különböző 14-3-3 izoformák vad típusú (*fekete oszlopok*) vagy domináns negatív (*szürke oszlopok*) változatát az egér TRESK csatornával. **B.** A háttér  $K^+$  áram normalizált visszaállása az ionomycin elvonását követő öt perc elteltével, ugyanazokban a sejtekben, mint az A panelen. A  $\gamma$  izoforma vad típusánál látható negatív visszaállítás azt jelenti, hogy a sejtek egy részénél a mérés végén még nagyobb volt az áram, mint az ionomycin elvonásakor. A 14-3-3 izoformákat *görög betűk* jelölik az *oszloppárok* alatt. A mérési módszer egyezik a 44. ábrán bemutatottal. Az  $\eta$  izoforma adatait a 44.B-E. ábrán bemutatott mérésekből összesítettem. Az oszlopokban a mért sejtek számát adtam meg. Módosítva az [5] közleményből.

A vad típusú 14-3-3 $\gamma$  izoforma koexpressziója az egér TRESK csatornával szignifikánsan csökkentette az ionomycinnel kiváltható normalizált áram növekedést és az ionomycin utáni normalizált K<sup>+</sup> áram visszaállás mértékét ( $p < 0.001$ , ANOVA, Tukey HSD teszt, 48. ábra). Eszerint tehát az  $\eta$  izoformán kívül, a 14-3-3 $\gamma$  erőteljesen befolyásolja a TRESK szabályozást. A  $\beta$ ,  $\varepsilon$  és  $\zeta$  izoformák hatása nem volt szignifikáns, azonban tendenciájában megfelelt a várt iránynak. Ezeknek az izoformáknak is lehet gyengébb TRESK szabályozó hatása, de az sem kizárható, hogy a domináns negatív változatuk heteromerizációval kivédte az oocyták endogén 14-3-3 funkcióját és a csökkent endogén 14-3-3 működés okozta az eltéréseket a mérés során. A  $\sigma$  és  $\tau$  izoformák nem hatottak a TRESK kalcium-függő szabályozására (48. ábra) [5].

A 14-3-3 fehérjének minden kísérletben megnyilvánult az a hatása, hogy gátolja a TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktiváció után (44., 45., 46. és 48.B ábrák). Mindemellett a biokémiai kísérletekből egyértelmű, hogy a 14-3-3 kihorgonyzódik az erősen konzervált RSNSCP motívumhoz (47. ábra). Ezért szinte ellenállhatatlan a csábítás, hogy a K<sup>+</sup> áram visszaállásra kifejtett 14-3-3 hatást az RSNSCP helyhez kötődéssel magyarázzuk. Ezzel azonban valószínűleg hibát követnénk el.

Ha 14-3-3 kötődése az RSNSCP motívumhoz lenne felelős az áram visszaállásának gátlásáért, akkor azt várhatnánk, hogy a motívum 14-3-3-kötést megakadályozó mutációja felgyorsítja a K<sup>+</sup> áram visszatérését a nyugalmi állapotba. Ez azonban egyáltalán nincs így, sőt éppen ellenkezőleg. Az S264A mutációról kimutattuk, hogy kivédi az RSNSCP motívum 14-3-3-kötését (47.C ábra). Ennek ellenére, az S264A mutáns egér TRESK, ionomycin utáni áram visszaállása jelentősen lassabb, mint a vad típusú csatornáé (49. ábra). Az S264A mutáns normalizált visszaállása a mérés végén  $-27 \pm 5$  % volt ( $n=8$ ), a vad típusú csatornáé viszont  $32 \pm 4$  % ( $n=14$ ,  $p < 10^{-8}$ , 49. ábra, A és C panel) [6]. A visszaállások különbözősége vitathatatlan, kijön akár abszolút, akár relatív visszaállást vagy visszaállási sebességet számítunk, hiszen az S264A mutáns árama a mért időtartományon belül még meg sem kezdi a visszaállást, hanem tovább nő, miközben a vad típusú csatorna árama egyértelműen csökken. Ez az eredmény erősen ellene szól annak az egyszerű hipotézisnek,

hogy a 14-3-3 kapcsolódása az RSNSCP motívumhoz gátolja a TRESK áram visszaállást, illetve a csatorna 14-3-3 kötésének hiányában a visszaállítás felgyorsul.



**49. ábra: Az S264A mutáns egér TRESK visszatérése a nyugalmi állapotba az ionomycin elvonása után lassabb, mint a vad típusú csatornáé**

**A.** Átlag áramokat ábrázoltam olyan petesejtekből, amelyek a vad típusú egér TRESK csatornát (wt., n=14) vagy annak S264A mutáns változatát (S264A, n=8) expresszálták. A csatornák bazális aktivitását benzocain (B., 1 mM) adásával jellemeztem, majd ionomycinnel (Iono., 0.5 μM) létrehoztam a kalcium-függő aktivációt, végül hosszan mértem az áram változásait az ionomycin kimosását követően. **B.** Normalizált áramokat számítottam az A panelen bemutatott K<sup>+</sup> áramokból, az I<sub>2</sub>/I<sub>1</sub> hányados formájában sejtenként és ezek átlagát ábrázoltam a két (wt. és S264A) csoportban. Az I<sub>1</sub> és I<sub>2</sub> áramokból a számítások előtt levontam a 2 mM EC [K<sup>+</sup>] jelenlétében mért kis nem-specifikus áramokat. A vad típusú egér TRESK árama mintegy kilencszeresre, az S264A mutánsé pedig kb. két és félszeresre aktiválódott ionomycin hatására. **C.** Normalizált visszaállást számítottam az egyes sejtek áramaiból az (I<sub>2</sub>-I<sub>3</sub>)/(I<sub>2</sub>-I<sub>1</sub>) képletnek megfelelően, ezt százalékban fejeztem ki és átlagukat ábrázoltam. Az S264A mutáns negatív visszaállás értéke arra utal, hogy az áram nem tért vissza a kiindulási érték felé, hanem tovább növekedett az ionomycin kimosását követően. Az I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> és I<sub>3</sub> áramok mérési időpontjait szürke nyilak jelölik az A panelen. Módosítva a [6] közleményből.

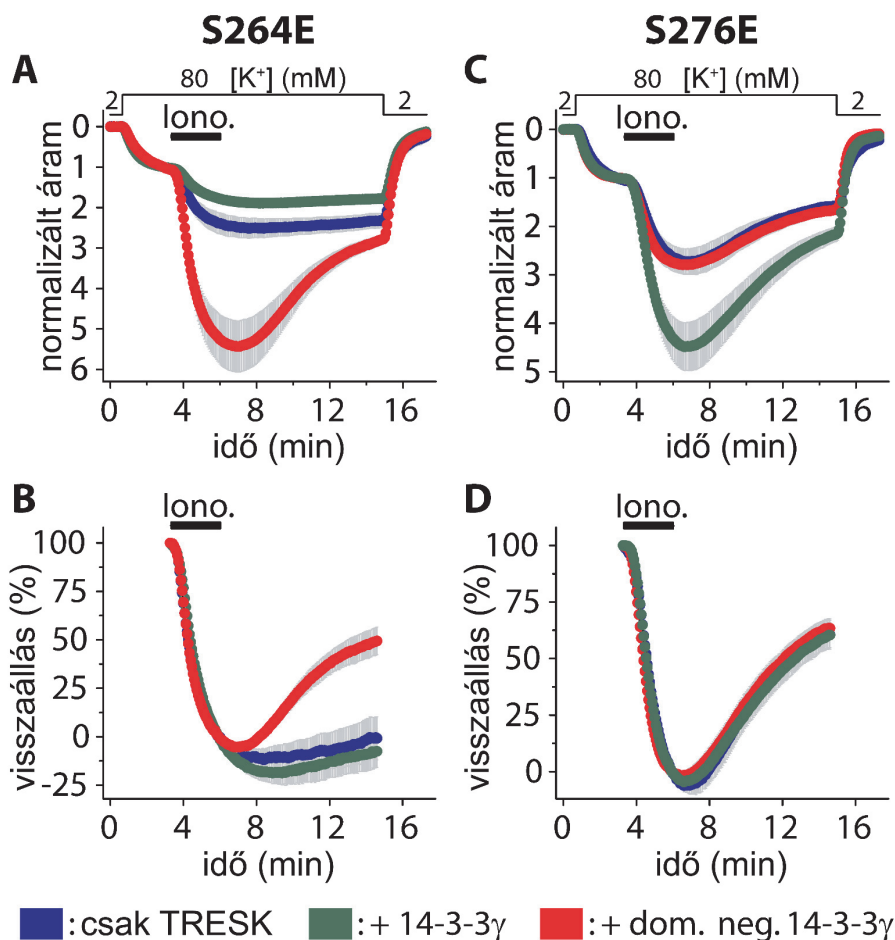
Mindemellett az S264A mutáns TRESK csatorna bazális körülmények között is részlegesen aktiváltnak tűnik, ahogy erről már volt szó az 5.7 fejezetben a 27. ábra kapcsán. Az S264 mutáns bazális áramát a benzocain erősebben gátolja, mint a vad típusú csatornáét (49.A ábra) és a relatív kalcium-függő aktivációja is elmarad a vad típusra jellemzőtől (49.B ábra). Ez felvetheti azt a gondolatot, hogy a 14-3-3 kötése a csatornához talán csökkenti annak aktivitását. Ez magyarázhatná az S264A mutáns magasabb bazális aktivitását a vad típushoz képest, hiszen a mutáns nem tud 14-3-3 fehérjét

kötni. Mindazonáltal az S264A mutáns csatorna kalcineurin-függő szabályozása leginkább az ép szerin klaszter defoszforilációjával valósulhat meg. Mivel az S264A mutáns áramának visszaállása a kalcium-függő aktivációból rendkívül lassú, ezért a szerin klaszter foszforiláció intenzitása is alacsony lehet, ami önmagában magyarázhatja a magas bazális csatorna aktivitást. A fenti eredmények alapján ezeket a lehetőségeket nem lehetett elkülöníteni.

Erőfeszítést tettem olyan kísérleti megközelítés kidolgozására, amely valamivel mélyebb betekintést enged a kalcium-függő TRESK szabályozás és a 14-3-3 komplex kapcsolatába. A vad típusú és domináns negatív 14-3-3 fehérjéket az S264E és S276E mutáns egér TRESK csatornákkal koexpresszáltam (50. ábra) [6]. Ez a megközelítés lehetővé tette, hogy elkülönítve vizsgáljam a két fő szabályozó régió hatásának összefüggését a 14-3-3 fehérjével. Az S264E mutáns esetében a TRESK csatorna egyik fő szabályozó régiójának, a 14-3-3 kötőhelynek a működését megszüntettük, ezért ennél a mutánsnál a szerin klaszteren (S274, 276 és 279) keresztül történő kalcium-függő szabályozást vizsgálhatjuk szelektíven. Fordítva, az S276E mutánsnál a szerin klaszter szabályozó működését akadályoztuk, ezért ennél a mutánsnál főként az S264-en és a 14-3-3-kötő RSNSCP motívumon keresztül létrejövő kalcium-függő szabályozást mérhetjük. A kísérletben negatív glutamáttal helyettesítettük a szerineket, hogy a kiiktatott működésű szabályozó helyeket inkább a gátolt állapothoz hasonlóan "fagyasszuk be", amely nagyobb teret enged a másik szabályozó hely hatásának kifejlődésére (a különbség különösen az S276A és S276E mutánsok aktivációja között számottevő, ld. 27.C ábra). A kísérletekben a vad típusú és domináns negatív 14-3-3 koexpresszió mellett, egy harmadik csoportban megmértem a kalcium-függő szabályozás tulajdonságait olyan sejtekben is, amelyek csak a mutáns csatornát expresszáltak. Ezekben a sejtekben az endogén 14-3-3 szint hatása jelentkezik, az eredmény tájékoztató jellegű és nem is használtam fel a statisztikai kiértékelésben.

Amikor az S264E mutáns TRESK csatornát koexpresszáltuk a vad típusú (wt14-3-3) vagy domináns negatív R57,61A 14-3-3 $\gamma$  adapter fehérjékkel

(dn14-3-3), akkor három fontos különbséget figyeltünk meg a felerősített, illetve csökkentett 14-3-3 funkcióval jellemezhető csoportok között.



**50. ábra: Az S264E és S276E mutáns TRESK csatornák lényegesen különböznek abban, hogy a vad típusú és domináns negatív 14-3-3 milyen hatást fejt ki rájuk**

**A.** Átlag normalizált áramokat ábrázoltam olyan petesejtek három csoportjából, amelyek csak az S264E mutáns (egér) TRESK csatornát (kék,  $n=6$ ) expresszálták, vagy az S264E mutáns csatornával koexpresszálták a vad típusú 14-3-3 $\gamma$  (zöld,  $n=10$ ), illetve a domináns negatív (R57,61A) 14-3-3 $\gamma$  (piros,  $n=12$ ) adapter fehérjét. A sejteket ionomycinnel (0.5  $\mu\text{M}$ ) ingereltem, majd az áram visszaállását hosszan mértem. A domináns negatív 14-3-3 hatására az S264E mutáns nagy aktivációja jött létre (piros). **B.** Normalizált visszaállásokat számítottam százalékban megadva az A panelen bemutatott regisztrátumokból, a 49.C ábrán megadott képlet szerint. A domináns negatív 14-3-3 jelenlétében az S264E mutáns árama gyorsan visszatért a nyugalmi érték felé. **C.** Átlag normalizált áramokat ábrázoltam olyan petesejtek három csoportjából, amelyek csak az S276E mutáns (egér) TRESK csatornát (kék,  $n=6$ ) expresszálták, vagy az S276E mutáns csatornával koexpresszálták a vad típusú 14-3-3 $\gamma$  (zöld,  $n=12$ ), illetve a domináns negatív (R57,61A) 14-3-3 $\gamma$  (piros,  $n=12$ ) adapter fehérjét. A vad típusú 14-3-3 hatására az S276E mutáns nagy aktivációja jött létre (zöld). **D.** Normalizált visszaállásokat számítottam százalékban megadva a C panelen bemutatott regisztrátumokból. A visszaállási kinetika megegyezett mindhárom csoportban, a görbék egymáson futnak. Módosítva a [6] közleményből.

Az első különbség a bazális áram nagyságában mutatkozott. Az S264E mutáns bazális árama ( $1.1 \pm 0.2 \mu\text{A}$ ,  $n=12$ ) szignifikánsan kisebb volt, ha a 14-3-3 funkciót visszaszorítottuk a dn14-3-3 koexpressziójával, mint a wt14-3-3 koexpresszáló sejtekben ( $2.0 \pm 0.2 \mu\text{A}$ ,  $n=10$ ,  $p<0.01$ ). A második különbség a kalcineurin-függő aktiváció relatív mértékében jelentkezett. A relatív aktiváció jóval nagyobb volt a dn14-3-3 csoportban ( $5.2 \pm 0.6$ -szoros, *piros görbe*), mint a wt14-3-3 koexpressziójánál ( $1.8 \pm 0.1$ -szeres, *zöld görbe*,  $p<10^{-4}$ , 50.A ábra). A harmadik különbség pedig a visszaállási sebesség változásában nyilvánult meg. Az S264E mutáns áramának visszaállása felgyorsult a dn14-3-3 csoportban ( $49 \pm 7 \%$ , *piros görbe*), azonban rendkívül lassú volt a wt14-3-3 jelenlétében ( $-8 \pm 8 \%$ , gyakorlatilag nincs visszaállás a mérési időtartományban, *zöld görbe*,  $p<10^{-4}$ , 50.B ábra) [6].

A gátolt bazális áram, a nagyobb relatív aktiváció és a felgyorsult visszaállás együtt azt mutatja, hogy az S264E mutáns TRESK csatornát szabályozó kináz aktiválódott a dn14-3-3 koexpresszió hatására. A S264 nem található meg ebben a csatornában (ez nyilvánvalóan nem foszforilálódhat), ezért a 14-3-3 azt a kinázt kell hogy gátolja, amely az S264E mutánsban megtartott szerin klasztert foszforilálja. Mivel a csatorna 14-3-3 kötőhelyét elroncsoltuk a mutációval, ezért az adapter fehérje ezt a hatását függetlenül hozza létre az RSNSCP kötőhelytől. A domináns negatív 14-3-3 azáltal gyorsította a visszaállást, hogy kivédte a szerin klasztert foszforiláló kináz 14-3-3 általi gátlását.

Mivel a fenti mechanizmus elfedi, a TRESK és 14-3-3 közötti, RSNSCP motívumon keresztül létrejövő, közvetlen kapcsolódás funkcionális jelentőségét nem lehet kikövetkeztetni a kísérletesen módosított 14-3-3 szint vad típusú csatornára kifejtett hatásából. Megkíséreltem azonban ezt az S276E mutáns vizsgálatával, amelyben a szerin klaszter foszforilációja (illetve ennek 14-3-3-függő szabályozása) akadályozott.

Az S276E mutánsnál a bazális áramot a wt14-3-3 koexpresszió gátolta ( $1.3 \pm 0.1 \mu\text{A}$ ,  $n=12$ ), a dn14-3-3 koexpresszáló csoporthoz viszonyítva ( $2.9 \pm 0.5 \mu\text{A}$ ,  $n=12$ ,  $p<0.01$ , a hatás fordítottja az S264E mutánsnál tapasztaltnak). A kalcineurin-függő relatív aktiváció a wt14-3-3 csoportban volt

nagyobb ( $4.3 \pm 0.4$ -szeres, *zöld görbe*), mint a dn14-3-3 csoportban ( $2.7 \pm 0.2$ -szeres, *piros görbe*,  $p < 0.01$ , 50.C ábra). Az S276E mutáns normalizált visszaállási kinetikáját viszont nem befolyásolta a funkcionális 14-3-3 szint változtatása (a *kék*, *zöld* és *piros* görbék átfednek az 50.D ábrán) [6].

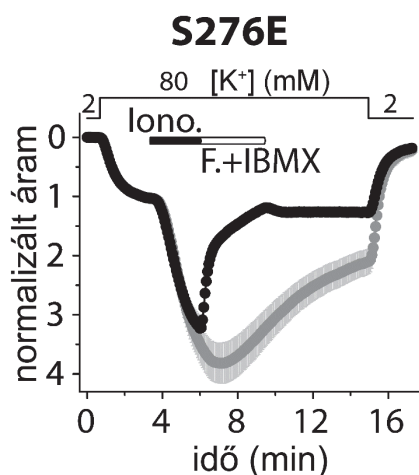
Az S276E mutáns kalcium-függő szabályozása vélhetően főként az S264 foszforiláción alapul. A változatlan normalizált visszaállási görbék arra utalnak, hogy a 14-3-3 nem befolyásolja az S264-et foszforiláló kináz reakciót. A változatlan visszaállási kinetika mellett jelentkező bazális áram gátlás 14-3-3 hatására, együtt a megnövekedett kalcineurin-függő relatív aktivációval, amellet szól, hogy a 14-3-3 kapcsolódása az RSNSCP motívumhoz csökkenti a csatorna aktivitást nyugalmi körülmények között [6].

Összefoglalva tehát, arra a következtetésre jutottam, hogy a 14-3-3 kétféle hatást is kifejt a TRESK csatornára. Egyrészt gátolja a szerin klasztert foszforiláló kinázt, az adapter fehérje csatornához kötődésétől függetlenül. Másrészt csökkenti a csatorna aktivitást, a foszforilált RSNSCP motívumhoz kapcsolódva. Ezeket a következtetéseket megerősítették az S264E és S276E mutánsokkal és pS-Raf259 mikroinjektálással végzett kísérletek is. A pS-Raf259 felgyorsította a (14-3-3 $\gamma$ -val koexpresszált) S264E mutáns TRESK normalizált visszaállását, de nem befolyásolta az S276E mutánsét, viszont megnövelte az S276E mutáns bazális áramát (*az adatokat nem mutatom*). Habár a pS-Raf259 mikroinjektálással végzett kísérletek is megerősítették a jól reprodukálható 14-3-3 koexpressziós eredményeket, az adatokból levont következtetések biztonsága elmarad az értekezés más részeiben leírtaktól, a 14-3-3-függő TRESK szabályozás meglehetősen komplexitása miatt. Felfogható úgy is, hogy a 14-3-3-függő TRESK szabályozásról levont következtetések megfelelnek egy jelenleg tartható munkahipotézisnek, amely kompatibilis a kísérleti eredményekkel, azonban a jövőben, a részletesebb vizsgálatok adatait is figyelembe véve, korrekcióra szorulhat.

## 5.12 A TRESK csatornát a protein kináz A és MARK foszforilálják

A TRESK csatorna szabályozó szerinjeit foszforiláló kinázok fenntartják a nyugalmi gátolt állapotot és emellett szerepet játszanak a háttér  $K^+$  áram visszatérésében a kiindulási értékére a kalcineurin-függő aktivációt követően. A(z) (egér) TRESK csatorna aktivitásának szabályozásáért felelős két fő régió, az S264-et tartalmazó RSNSCP és a szerin klasztert (S274, 276 és 279) magába foglaló RLSCSILSN nem felelnek meg pontosan egyik kináz foszforilációs konszenzus szekvenciájának sem. Egyes internetes predikciós eszközök azonban valószínűsítették, hogy az S264 szabályozó aminosavat a protein kináz A (PKA) foszforilálja.

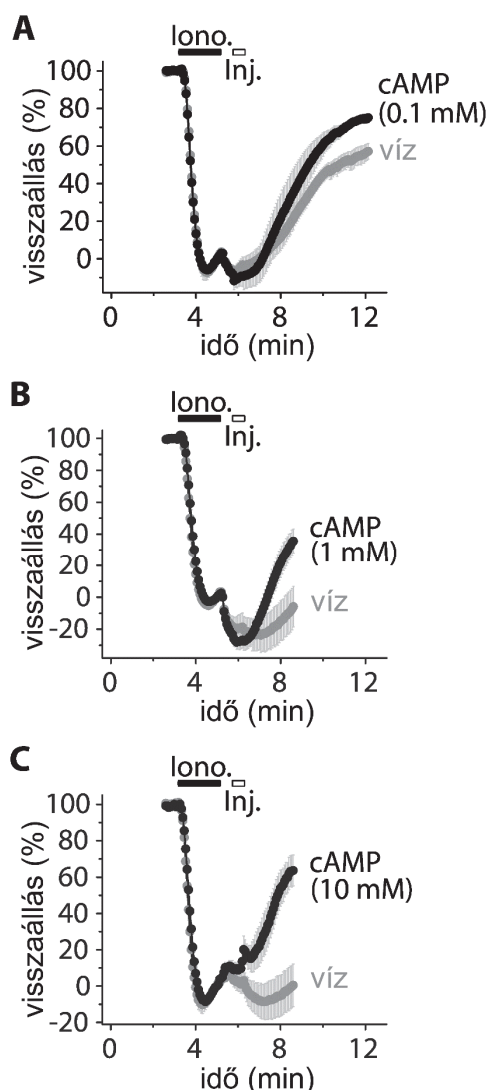
A PKA hatását az S276E mutáns csatornán vizsgáltam. Mivel a szerin klaszter foszforilációjának döntő jelentősége van a TRESK aktivitás meghatározásában, ezért a PKA S264-en érvényesülő szabályozó hatása könnyebben kimutatható az S276E mutáns vizsgálatával, mint a vad típusú csatorna mérésével. Az S276E mutánsban a szerin klaszter zavaró hatása kevésbé érvényesül, ezért az S264 szabályozó szerepe jobban megnyilvánul. Az ionomycinnel aktivált S276E mutáns csatornához a PKA-t közvetetten serkentő forskolin és IBMX (3-izobutil-1-metilxantin) keverékét adtam, amelynek hatására az áram visszatérése a nyugalmi állapotba felgyorsult. A gyorsabb visszaállás a nagyobb sebességű foszforiláció következménye, vagyis a kísérlet alátámasztja a következtetést, hogy az S264 szabályozó szerint a PKA foszforilálja (51. ábra). Hasonló áram visszaállás gyorsító hatás az S264E mutáns TRESK csatornánál nem jött létre (*az adatokat nem mutatom*) [6].



**51. ábra: A forskolin és IBMX keveréke felgyorsítja az S276E mutáns TRESK csatorna áramának visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően**

Az S276E mutáns (egér) TRESK csatornát és 14-3-3 $\gamma$  fehérjét koexpresszáló petesejteket ionomycinnel (*Iono.*, 0.5  $\mu$ M) ingereltem, majd a sejtek egyik csoportjánál forskolin (50  $\mu$ M) adenilát-cikláz aktivátor és IBMX (1 mM) foszfodiesteráz gátló keverékét (*F.+IBMX*) adtam (*fekete görbe*,  $n=11$ ), a kontroll sejteknél pedig csak megfelelő koncentrációjú DMSO oldószert (*szürke görbe*,  $n=7$ ). Módosítva a [6] közleményből.

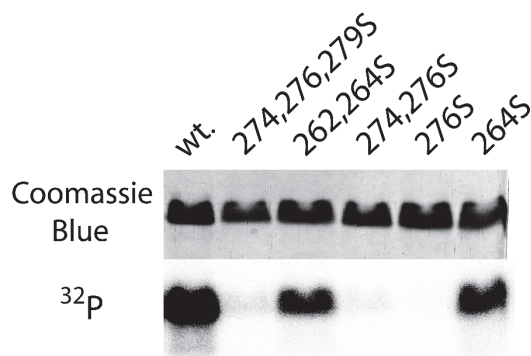
A PKA szabályozásban betöltött szerepének megerősítésére megvizsgáltam a cAMP mikroinjektálás hatását az S276E mutáns csatorna ionomycin utáni áram visszaállására. Hasonlóan a [cAMP] farmakológiás növeléséhez, a cAMP mikroinjektálás is gyorsította a háttér  $K^+$  áram visszatérését a nyugalmi állapotba (52. ábra) [6].



**52. ábra: Az S276E mutáns TRESK áramának visszaállását gyorsítja a cAMP mikroinjektálás**

**A.** Az S276E mutáns (egér) TRESK csatornát és 14-3-3 $\gamma$  fehérjét koexpresszáló petesejteket ionomycinnel (*Iono.*, 0.5  $\mu$ M) ingereltem, majd a sejteket cAMP-vel (50 nl, 0.1 mM, *fekete görbe*,  $n=6$ ), vagy vízzel (*szürke görbe*,  $n=5$ ) mikroinjektáltam. Az ionomycin kimosásának kezdetekor, a mérőelektrodokon kívül egy harmadik (injektáló) mikrokapillárist szúrtam a sejtbe, majd az *üres vízszintes téglalap* időtartamán belül injektáltam a cAMP oldatot (*Inj.*). Az injektáló kapilláris beszúrása és az injektálás kismértékben növelte a nem specifikus csurgó (leak) áramot. Az áram regisztrátumokból százalékban megadott normalizált visszaállást számítottam a 49.C ábrán bevezetett képlet szerint. A mérés végén a 0.1 mM cAMP-vel injektált sejtek árama szignifikánsan jobban közelített a nyugalmi állapothoz, mint a vízzel injektált sejteké ( $p<0.05$ , Student t-teszt). **B.** Az A panelen bemutatott kísérletet elvégeztem 1 mM cAMP (50 nl) injektálásával ( $n=2\times 6$ ). A regisztrátumok végpontjában, a cAMP-vel injektált sejtekben az áram visszaállása meghaladta a kontroll áramét ( $p<0.02$ ). **C.** Az injektált cAMP koncentrációja 10 mM volt ebben a kísérletben ( $n=5$  vagy 6,  $p<0.002$ ). A három panelen bemutatott méréseket három különböző petesejt preparátumból végeztem. Módosítva a [6] közleményből.

Annak megerősítésére, hogy az S264 aminosavat tényleg foszforilálja a PKA, *in vitro* foszforilációs kísérletet végeztem. A 29.A ábrán bemutatott kísérletben használt TRESKloop-His<sub>8</sub> fúziós fehérje szubsztrátokat és módszert alkalmaztam, azonban a *Xenopus* ovárium citoszol helyett itt a SIGMA cégtől vásárolt PKA holoenzimet adtam a reakcióhoz 1 mM cAMP, 50  $\mu$ M hideg ATP és 50 kBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP jelenlétében (53. ábra) [5].



**53. ábra: Az egér TRESK csatorna S264 aminosavát *in vitro* foszforilálja a PKA**

A 29.A ábrán bemutatott kísérlethez hasonlóan foszforiláltattam a különböző TRESKloop-His<sub>8</sub> szubsztrátokat PKA-val. Az egyes szubsztrát fehérjék csak a panel felső részén jelölt szerineket tartalmazták, az összes többi szerin és treonin aminosavat alaninra cseréltem az egér TRESK 185-292 régiójában. Módosítva a [5] közleményből.

A PKA foszforilálta azokat a szubsztrát konstrukciókat, amelyek tartalmazták az S264 aminosavat. Az a TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérje is jól foszforilálódott, amelyben az S264 volt az egyetlen szerin (53. ábra, *jobb szélső sáv*). Gyakorlatilag egyáltalán nem foszforilálta viszont a PKA azokat a konstrukciókat, amelyekben a szerin klaszter aminosavai voltak megtartottak. Az *in vitro* foszforilációs kísérlet tehát megerősítette, hogy a PKA foszforilálja az S264 aminosavat, emellett megmutatta, hogy a szerin klaszter nem szubsztrátja a PKA-nak [5].

Tekintve a szerin klaszter (S274, 276 és 279) kiemelkedő jelentőségét a TRESK kalcium-függő szabályozásában, mindenképpen szerettem volna olyan kinázt azonosítani, amely ezeket az aminosavakat foszforilálja. Mint a fenti kísérletekből látható, pl. a PKA nem alkalmas erre a célra. Úgy gondolkodtam, hogy olyan kinázt kell találnom, amelynek koexpressziója a TRESK csatornával felgyorsítja az áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktiváció után, vagyis funkcionális hatást is kifejt és nem csak *in vitro* mutatható ki a foszforiláló hatása a szerin klaszteren. Ezért a gyanúba jövő kinázok cDNS-ét megklónoztuk, koexpresszáltuk a TRESK csatornával, majd az ionomycin kimosás közben létrejövő áram visszaállást ugyanabban a petesejt preparátumban a csak TRESK csatornát kifejező kontroll sejtekéhez hasonlítottuk.

Hamar megvizsgáltam a protein kináz C (PKC) lehetséges szerepét a TRESK visszaállásban, hiszen ehhez nem kellett molekuláris biológiai előkészületeket tenni. A konvencionális és új típusú (novel) PKC izoformákat aktiváló PMA (forbol 12-mirisztát 13-acetát, 100 nM) nem gyorsította az egér TRESK csatorna áram visszaállását, tehát ezek a PKC izoformák nem vesznek

részt a szerin klaszter foszforilációjában (a PKC hatásának további részleteit ld. az 5.13 fejezetben). Az egyik online predikciós program kiadta a glikogén-szintáz-kináz 3 $\beta$  enzimet (GSK3 $\beta$ ), mint lehetséges találat a szerin klaszter foszforilációra. Azonban a GSK3 $\beta$  koexpresszió nem változtatta a TRESK áram visszaállás kinetikáját. Arra gondolva, hogy lehetséges, hogy a TRESK csatornával koexpresszált GSK3 $\beta$  nem elég aktív, megmértem a konstitutívan aktívvá alakított, S9A mutáns GSK3 $\beta$  hatását is. Azonban ez sem befolyásolta a TRESK visszaállási sebességet.

A szerin klaszter három szerint is tartalmaz egymáshoz aránylag közel és ez felvetette, hogy az egyik foszforilációja befolyásolhatja a másikat. Mivel szekvenciális foszforilációs reakciókban gyakran szerepelnek, megmértem a kazein kináz 1 (CK1) és kazein kináz 2 (CK2) hatását a TRESK visszaállásra. Mivel a CK2-nek több alegysége ismert, ezért a CK2 $\alpha$ 1, CK2 $\alpha$ 2 és CK2 $\beta$  különböző kombinációinak koexpresszióját is teszteltem a TRESK csatornával. Az *E.coli*-ban termeltetett GST-CK2 $\alpha$ 1 fúziós fehérje mikroinjektálásával is próbálkoztam, amely *in vitro* foszforilálta a tejfehérjéket, tehát biztosan mutatott enzimaktivitást. Azonban mindhiába, a TRESK visszaállás változatlan maradt.

Újabb és újabb hipotézisek alapján egyre többféle vad típusú kinázt és az irodalmi adatok szerint konstitutívan aktívvá tett változatukat teszteltem a TRESK visszaállásra *Xenopus* petesejtekben, sikertelenül. Eltelt hat év és a vizsgált kináz típusok száma meghaladta a húszat (II. táblázat). Mindeközben megkíséreltem oszlopkromatográfiás (FPLC) módszerrel a kinázt megtisztítani egér agy citoszolból úgy, hogy a kromatográfiás frakciókat radioaktív jelöléses, TRESK hurok foszforilációs módszerrel analizáltuk. A hidegszobában töltött hetek azonban nem vezettek eredményre, mivel nem kaptam olyan kromatográfiás frakciót, amelyben az aktív kináz megfelelő mennyiségben és tisztán lett volna jelen a tömegspektrometriás azonosításhoz.

Mivel az emlős genomban több mint 300 gén kódol szerin/treonin kinázt [299,300], felmerült a magas áteresztőképességű módszerek alkalmazásának lehetősége is, azonban ezek a tervek nem jutottak el a gyakorlati megvalósításig, a horrorális erőforrás és anyagi igény miatt.

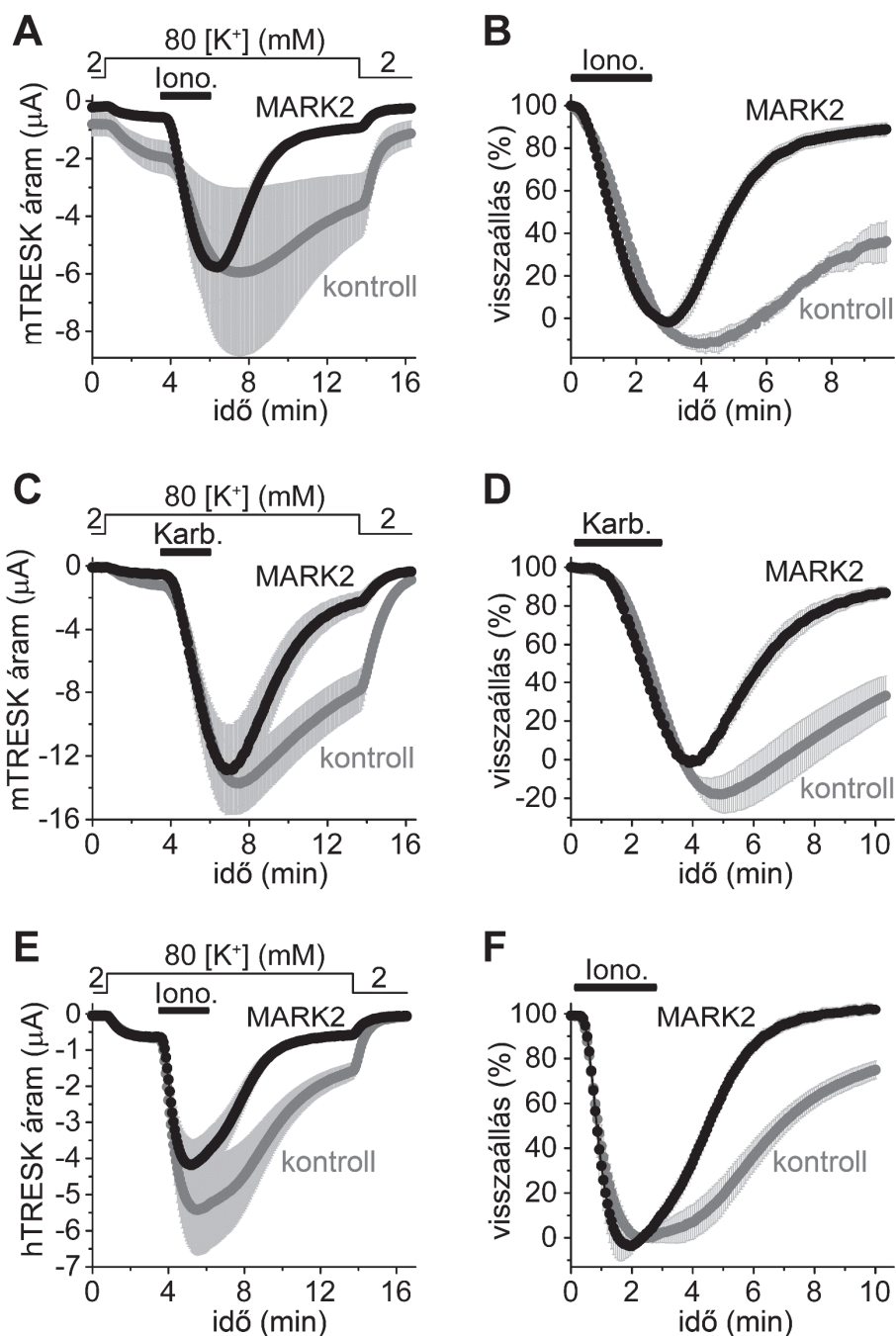
**II. táblázat. A *Xenopus* petesejt expressziós rendszerben az egér TRESK csatornával koexpresszált vad típusú (wt) és konstitutívan aktív (ca) kináz konstrukciók, amelyek nem gyorsították a K<sup>+</sup> áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktiváció után (betűrendben).**

A kinázok nevének irodalomban gyakran használt rövidítését adtam meg a táblázatban. A C-terminális csomólast zárójelben jelöltem, pl. az (1-324AA) konstrukció a kináz N-terminális 324 aminosavát tartalmazta. Az N-terminális csomólast Δ jel után tüntettem fel. A mutációknál az aminosavak egybetűs kódját használtam. \*A CHK1 konstrukciók visszaállásra kifejtett hatásának megítélését nehezítette, hogy ezek gátolták a kalcium-függő aktiváció nagyságát. \*\*A CK2β-t koexpresszáltam a CK2α1 vagy CK2α2 alegységekkel. \*\*\*A PKA *in vitro* nem foszforilálja a szerin klasztert. \*\*\*\*A PKC konvencionális és novel izoformáit nem klónoztam, hanem PMA-val aktiváltam. Módosítva a [7] közleményből.

|    | Kináz konstrukció     | Típus |    | Kináz konstrukció                 | Típus |
|----|-----------------------|-------|----|-----------------------------------|-------|
| 1  | AMPKα1                | wt    | 22 | C-Raf1                            | wt    |
| 2  | AMPKα1-T183D          | ca    | 23 | C-Raf1-Δ1-319,P320M               | ca    |
| 3  | AMPKα1(1-324AA)       | ca    | 24 | ERK2                              | wt    |
| 4  | AMPKα1(1-324AA)-T183D | ca    | 25 | GRK2                              | wt    |
| 5  | B-Raf1                | wt    | 26 | GSK3β                             | wt    |
| 6  | B-Raf1-Δ1-426,R427M   | ca    | 27 | GSK3β-S9A                         | ca    |
| 7  | B-Raf1-Δ1-464,R465M   | ca    | 28 | MAPKAP-K2-kinase domain-T208E     | ca    |
| 8  | CamKIIβ               | wt    | 29 | MEK1-S218,222E                    | ca    |
| 9  | CamKIIβ-T287D         | ca    | 30 | PKA***                            | wt    |
| 10 | CASK                  | wt    | 31 | PKB-Δ1-128                        | ca    |
| 11 | CASK-Δ1-373,V374M     | ca    | 32 | PKB-Δ1-128 N-mirisztoilációs mut. | ca    |
| 12 | CASK-S24D+V26L        | ca    | 33 | PKC (conventional)****            | wt    |
| 13 | CDK1                  | wt    | 34 | PKCζ                              | wt    |
| 14 | CDK1-T14A,Y182E       | ca    | 35 | PKCζ-A119E                        | ca    |
| 15 | CHK1(1-352AA)*        | ca    | 36 | PLK1                              | wt    |
| 16 | CHK1(1-416AA)*        | ca    | 37 | PLK1-T210D                        | ca    |
| 17 | CHK2                  | wt    | 38 | SIK(1-343AA)                      | tr    |
| 18 | CK1α                  | wt    | 39 | SIK(1-343AA)-T182E                | ca    |
| 19 | CK2α1                 | wt    | 40 | TGFβR I                           | wt    |
| 20 | CK2α2                 | wt    | 41 | TGFβR II                          | wt    |
| 21 | CK2β**                | wt    | 42 | TGFβR I-T204D                     | ca    |

Utoljára a figyelmem előterébe a 14-3-3 által gátolt kinázok kerültek, mivel közvetett módon arra a következtetésre jutottam, hogy ez az adapter fehérje gátolja a szerin klaszter foszforilációját katalizáló kinázt (ld. az 5.11 fejezetben). Irodalmi adatok alapján így került a látóterembe a Mikrotubulus(-asszociált fehérje)-Affinitás-Reguláló-Kináz, MARK2 (PAR-1) [301], melynek koexpresszióját szintén kipróbáltam a TRESK csatornával (54. ábra).

Az egér TRESK csatornát MARK2 kinázzal koexpresszáló petesejtekben a bazális háttér K<sup>+</sup> áram ( $0.34 \pm 0.04 \mu\text{A}$ , n=9) szignifikánsan kisebb volt a csak csatornát kifejező sejtekhez képest ( $1.05 \pm 0.17 \mu\text{A}$ , n=6, p<0.01). Ionomycin (0.5 μM) hatására a MARK2-t is kifejező sejtekben a K<sup>+</sup> áram arányában jobban



**54. ábra: A MARK2 koexpressziója a TRESK csatornával felgyorsítja a  $K^+$  áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően**

**A.** Az egér TRESK csatornát a MARK2 kinázzal koexpresszáló (*fekete görbe, MARK2*), vagy a csak csatornát kifejező sejtek (*szürke görbe, kontroll*) átlag háttér  $K^+$  áramai láthatók, a sejtek ionomycinnel (*lono.*, 0.5  $\mu$ M) történő ingerlése közben. **B.** Normalizált visszaállást számítottam százalékban az A panelen bemutatott adatokból, a 49.C ábrán ismertetett képlet szerint. **C és D.** Hasonló kísérletet végeztem, mint az A és B panelen, egér TRESK csatornát,  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort és MARK2 kinázt koexpresszáló sejtekkel (háromszoros koexpresszió, *fekete MARK2 görbe*), illetve csak csatornát és receptort kifejező sejtekkel (*szürke kontroll görbe*). A sejteket karbachollal (*Karb.*, 1  $\mu$ M) ingereltem. **E és F.** Az A és B panelen bemutatott kísérletet elvégeztem humán TRESK csatornával. Módosítva a [7] közleményből.

növekedett ( $14.2 \pm 2.7$ -szeres aktiváció), mint a kontroll sejtekben ( $3.7 \pm 1.7$ -szeres növekedés,  $p < 0.02$ ). Ezek mellett a régóta várt fontos hatást is létrehozta a MARK kináz, vagyis a MARK2 koexpresszió következtében drámai módon felgyorsult a TRESK áram visszatérése a nyugalmi állapotba a kalcineurin-függő aktiváció után. A MARK2-t is kifejező sejtekben a mérés időtartamában a  $K^+$  áram jó közelítéssel visszatért a kiindulási értékre ( $89 \pm 3$  % normalizált visszaállás), amíg a kontroll sejtekben csak alig közelített ahhoz ( $36 \pm 9$  %,  $p < 10^{-4}$ , 54.B ábra). A MARK2 koexpresszió miatt csökkent bazális  $K^+$  áram, fokozott relatív aktiváció ionomycin hatására és a felgyorsult visszaállás az ionomycin megvonását követően egybehangzó azzal a következtetéssel, hogy a MARK2 a kritikus szabályozó pontokon foszforilálja a TRESK csatornát [7].

Nagyon kis mennyiségű MARK2 cRNS injektálása (0.16 ng/sejt) elég volt ahhoz, hogy a TRESK áram visszaállása szignifikánsan gyorsuljon (*az adatokat nem mutatom*). Ez azt sugallja, hogy a hatáshoz nem volt szükséges a kináz nagyon kifejezett túlexpresszáltatása. A MARK2 koexpresszió akkor is gyorsította a TRESK áram visszatérését a nyugalmi szintre, ha a kalcium-függő aktivációt a koexpresszált  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptor ingerlésével váltottam ki. A TRESK csatornát,  $M_1$  receptort és MARK2-t koexpresszáló sejtekben a  $K^+$  áram visszaállása a receptor ingerlés megszüntetése után szignifikánsan gyorsabb volt ( $87 \pm 3$  % normalizált visszaállás a mérés végén,  $n=10$ , *fekete görbe*), mint a csak csatornát és receptort koexpresszáló kontroll sejtekben ( $33 \pm 11$  % normalizált visszaállás,  $n=13$ ,  $p < 0.001$ , *szürke görbe*, 54.D ábra). Vagyis a MARK2 felgyorsította a TRESK áram visszatérését a nyugalmi helyzetbe, az ionomycinnél összetettebb jelátvitelt elindító receptor ingerlés után is [7].

Ebben a kísérletben, a MARK2-t is koexpresszáló csoportban, a TRESK áram relatív aktivációja kiemelkedő, korábban nem tapasztalt mértéket öltött, az áram  $30.0 \pm 4.9$ -szeresére növekedett a receptor ingerlés hatására (*fekete görbe*, 54.C ábra). A receptor-függő TRESK szabályozás dinamikus tartománya tehát figyelemreméltó, a receptor ingerlés bizonyos körülmények között akár 30-szoros áram amplitúdó változást is létrehozhat [7].

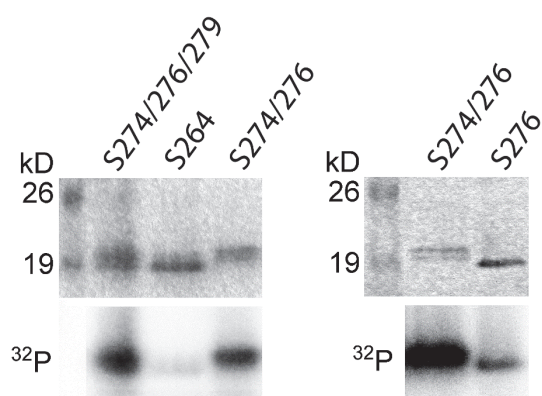
A szerin klaszter szekvenciája a humán csatornában (RLSYSIISNLD) eltér az egér ortológától (RLSCSILSNLD). Emiatt felmerül a kérdés, hogy vajon a MARK2 hat-e a humán csatornára. Ezért a korábban egér csatornával elvégzett koexpressziós kísérletet (54.A és B) megismételtem a humán TRESK-kel is (54.E és F ábra). A humán TRESK csatornát és MARK2-t koexpresszáló csoportban a visszaállás teljessé vált a mérés végére ( $102 \pm 2$  % normalizált visszaállás,  $n=7$ ), szemben a csak csatornát kifejező csoporttal, ahol az aktiváció kb. negyedrésze még fennmaradt ( $75 \pm 4$  % visszaállás,  $n=7$ ,  $p<0.001$ , 54.F ábra). A MARK2 felgyorsította a TRESK áram visszatérését a kiindulási állapotba, függetlenül a két ortológ szerin klaszter területén eltérő aminosav szekvenciájától [7].

Számos további kísérlettel igazoltuk a MARK2 szerepét a TRESK csatorna szabályozó foszforilációjában. Előállítottuk a GST-MARK2-T208E,T539A fúziós fehérjét, amely a T208E mutáció miatt konstitutívan aktív kináz és a T539A mutáció miatt pedig érzéketlen az atípusos protein kináz C általi 14-3-3-függő gátlásra az irodalmi adatok szerint [301]. Ha ezt a fehérjét mikroinjektáltuk a humán TRESK csatornát és 14-3-3 $\eta$  fehérjét koexpresszáló petesejtekbe, akkor felgyorsult az ionomycin utáni  $K^+$  áram visszaállás, de ha előtte hődenaturáltuk az enzimet, akkor az már nem tudta a visszaállás gyorsító hatást létrehozni (*az adatokat nem mutatom*) [7]. Az injektált MARK2 fehérje is létrehozta tehát a TRESK gátló hatást, ehhez nem volt feltétlenül szükséges a kináz hosszútávú expressziója. Mindemellett a kináz enzimaktivitása elengedhetetlen a TRESK gátlás kialakításához.

Összehasonlítottuk a konstitutívan aktív és inaktív MARK2 változatok koexpressziójának hatását is. A MARK2-T208E,S400A,T539A konstitutívan aktív és két 14-3-3-kötőhelyen is mutáns kináz változat koexpressziója az egér TRESK csatornával felgyorsította a  $K^+$  áram visszaállását ionomycin után. Ezzel ellentétben, a MARK2-T208A,S212A,S400A,T539A inaktív kináz változat koexpressziója nem hatott, a visszaállás mértéke nem különbözött a csak csatornát kifejező sejtekben mérhetőtől (*az adatokat nem mutatom*). A MARK2 kináz aktivitása ebben a kísérletben is nélkülözhetetlen volt a TRESK áram visszaállást gyorsító hatáshoz, amely tehát foszforiláción alapul [7].

A MARK2 erőteljes hatása miatt ugyan gyanítható, hogy a kináz célpontja a szerin klaszter, de azért a szakma szabályainak megfelelően elvégeztük az áram visszaállás vizsgálatát az S264E mutáns egér TRESK csatornán is. A vártak megfelelően a MARK2 koexpressziója (ebben a kísérletben a vad típusú kinázt használtuk) felgyorsította az S264E mutáns csatorna áramának visszatérését is a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően (*az adatokat nem mutatom*). Ebben a csatorna konstrukcióban az S264 szabályozó szerepe nyilvánvalóan nem érvényesült a mutáció miatt, tehát a visszaállás gyorsító hatás a szerin klaszter foszforilációján keresztül jött létre [7].

Fehérje foszforilációs *in vitro* kísérlettel megerősítettük, hogy a MARK2 tényleg foszforilálja a szerin klaszter aminosavait. A 29. és 53. ábrákon bemutatott TRESKloop-His<sub>8</sub> fehérjéket használtuk szubsztrátként (55. ábra).



**55. ábra: A MARK2 *in vitro* foszforilálja a szerin klaszter aminosavait az egér TRESK csatorna hurok régióban**

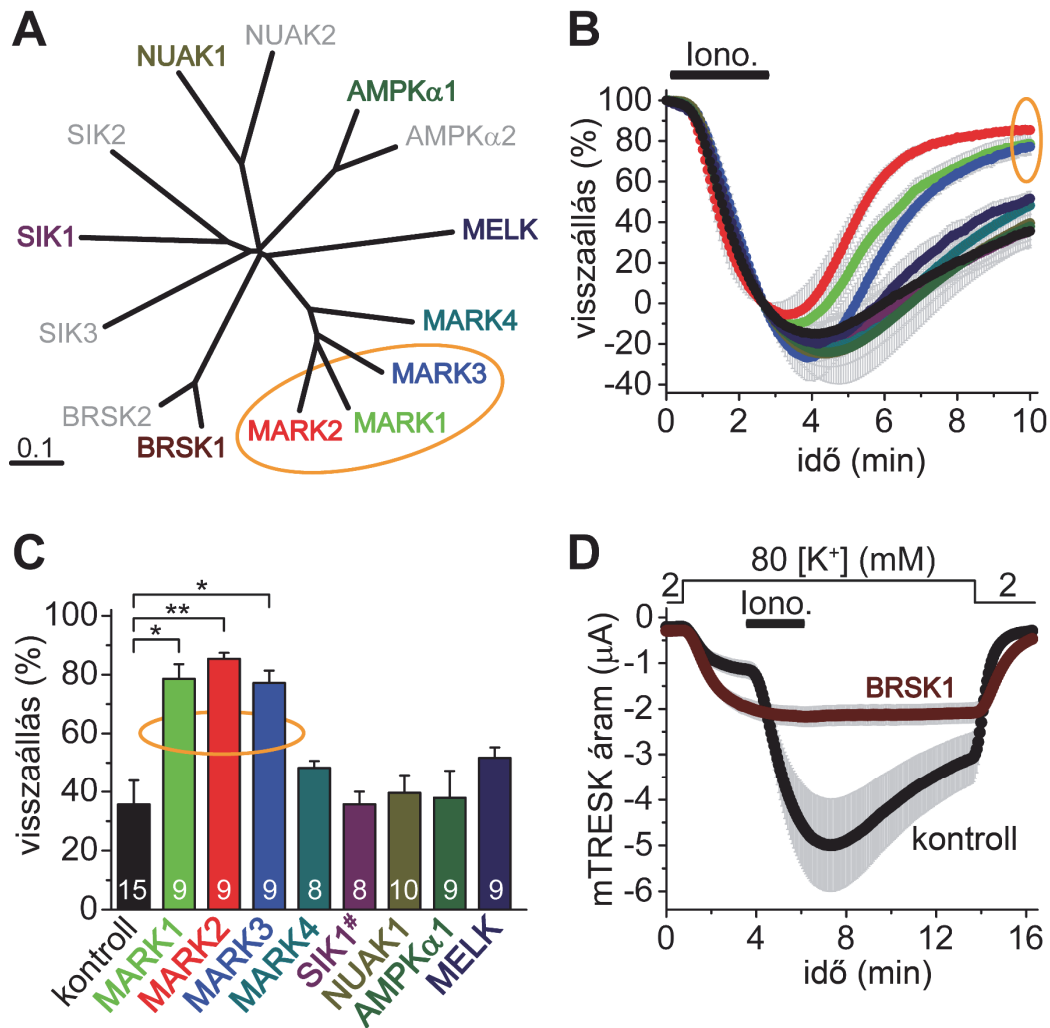
A mutáns TRESKloop-His<sub>8</sub> szubsztrátokat a rekombináns, konstitutívan aktív GST-MARK2-T208E kinázzal foszforiláltattuk, a 29.A és 53. ábrákon bemutatott módszerrel. A szubsztrátokban csak az ábra felső részén jelölt szerinek voltak megtartottak. Felül a Coomassie kékkel festett SDS-PAGE gélek, alul az autoradiogramok láthatók. Módosítva a [7] közleményből.

A TRESKloop-His<sub>8</sub> szubsztrátok az egér TRESK 185-292 aminosavakat tartalmazták és bennük a vizsgálni kívánt szerin aminosavakon kívül minden egyéb szerint és treonint alanin helyettesített. A konstitutívan aktív rekombináns MARK2 foszforilálta azt a szubsztrát fehérjét, amelyben csak szerin klaszter három aminosava volt megtalálható (55. ábra S274/276/279, *bal oldali sáv*). Azonos körülmények között, hasonlóan foszforilálódott az a konstrukció is, amelynek szerin klaszterében csak az S274 és S276 aminosav volt megtartott (55. ábra, *bal oldali panel S274/276 sáv*). Nem foszforilálta viszont a MARK2 az S264 aminosavat abban a konstrukcióban, amelyben egyedül ez a szerin volt jelen (55. ábra, S264 sáv). Összességében elmondható, hogy a TRESK szabályozó szerinek MARK2 általi foszforilációs mintázata komplementere a

PKA-ra jellemző szubsztrát-specifitásnak. A PKA foszforilálja az S264 aminosavat, de a szerin klaszter nem szubsztrátja (53. ábra). Ezzel szemben a MARK2 foszforilálja a szerin klasztert, azonban nem hat az S264-re (55. ábra). A szerin klaszter *in vitro* közvetlen foszforilációja valószínűsíti, hogy a MARK2 funkcionális hatása a TRESK csatornára ezen a foszforiláción alapul [7].

A szerin klaszteren belül az egyes aminosavak foszforilációjának feloldása mutációs analízissel nem kivitelezhető megnyugtató módon. Az egyes szerinek közel találhatók egymáshoz, ezért nagyon valószínű, hogy az egyik mutációja egyben befolyásolja a másik foszforilációját is. Ennek ellenére megvizsgáltuk annak a TRESKloop-His<sub>8</sub> konstrukciónak is a foszforilációját, amelyben egyedül az S276 aminosav volt megtartott. Ez a konstrukció is foszforilálódott, habár jóval kevésbé, mint az, amelyikben az S274 és S276 együtt volt megtalálható (55. ábra, *jobb oldali panel*, vö. *S274/276 és S276 sávokat*). Ebben a kísérletben kétszer nagyobb mennyiségű, 100 kBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-t adtunk a reakciókhoz, ugyanakkora (20  $\mu$ M) hideg [ATP] mellett, mint a *bal oldali paneleken* látható kísérletben.) A MARK2 tehát foszforilálja a legnagyobb funkcionális hatást kifejtő S276 aminosavat is, azonban a kináz preferenciája az S274 és S276 aminosavak között, illetve ezek foszforilációjának aránya a kvalitatív kísérletből nem megállapítható. Mindenesetre az S274 és S276 együtt biztosítja a szerin klaszter erőteljes MARK2 általi foszforilációját [7]. (Az a konstrukció, amelyben egyedül az S279 volt jelen, nem foszforilálódott MARK2 hatására. *A reakciót nem mutatom.*)

A MARK2 az AMPK-rokon kinázok családjába tartozik. A család a nevét az AMP-függő protein kinázról (AMPK) kapta, amelyet az adenosin-monofoszfát (AMP) koncentráció növekedésén keresztül a sejt metabolikus állapota szabályoz. Kíváncsiak voltunk, hogy a kináz család mely tagjai foszforilálják a TRESK csatornát. Ezért az AMPK-rokon kinázok alcsaládjaiból egy-egy képviselőt megklónoztunk és hatásukat a TRESK áram visszaállásra meghatároztuk (56. ábra). Vizsgáltuk az AMPK $\alpha$ 1, BRSK1 (Brain-Specific Serine/Threonine Kinase 1, SAD1, SAD-B, “synapses of amphids defective”), NUAK1, MELK (Maternal Embryonic Leucine zipper Kinase) és SIK1 (Salt



**56. ábra: A MARK1, 2 és 3 gátolja a TRESK csatornát, a BRSK1 a MARK kinázoktól eltérő módon hat, a többi AMPK-rokon kináz pedig nem befolyásolja a kalcium-függő aktiváció utáni K<sup>+</sup> áram visszaállást**

**A.** Az egér AMPK-rokon kinázok aminosav szekvenciáját összehasonlító dendrogramot láthatjuk. Szürkétől eltérő színek jelölik azokat a kinázokat, amelyek koexpressziójának hatását megvizsgáltuk az egér TRESK csatorna visszaállási kinetikájára. A TRESK visszaállást gyorsító MARK kinázokat narancssárga ellipszis mutatja. A dendrogram a Clustal W2 és TreeView programokkal készült. A dendrogram alatti lépték aminosavanként átlagosan 0.1 helyettesítésnek megfelelő szekvencia különbséget jelöl. **B.** Normalizált K<sup>+</sup> áram visszaállási kinetikákat ábrázoltuk a különböző AMPK-rokon kinázokat egér TRESK csatornával koexpresszáló petesejtekből. A kalcium-függő aktivációt ionomycinnel (*iono.*, 0.5 μM) váltottuk ki. A színek megfelelnek az A panelnek. A visszaállást gyorsító MARK kinázokat narancssárga ellipszis jelöli. **C.** A mérés végén létrejövő normalizált K<sup>+</sup> áram visszaállások átlagát mutatjuk a különböző csoportokban. Az oszlopokban a mért sejtek száma látható. A SIK1 konstrukció (*SIK1*<sup>#</sup>) csak a kináz domént (1-343 aminosavak) tartalmazta. A visszaállás a MARK1, 2 és 3 csoportokban szignifikánsan meghaladta a kontroll (csak TRESK csatornát kifejező) sejtekre jellemzőt (ANOVA, majd Tukey HSD teszt, \**p*<0.01, \*\**p*<0.001). **D.** A BRSK1 kináz TRESK csatornával koexpresszáló sejtekben nem jött létre aktiváció ionomycin hatására (*barna BRSK1 görbe*, *n*=16), eltérően a csak csatornát kifejező sejtektől (*kontroll*, *n*=15). Módosítva a [7] közleményből.

Inducible Kinase 1) kinázokat. A SIK1 kináz nagy mérete miatt annak csak a kináz domén részét (1-343 aminosavak) használtuk, illetve konstitutívan aktívvá tett T182E mutáns változatával dolgoztunk. A MARK alcsalád minden tagját megklónoztuk (MARK1-4) (56.A ábra) [7].

Az AMPK-rokon kinázokat az (egér) vad típusú TRESK csatornával koexpresszáltuk és az ionomycinnel kiváltott aktivációt követő áram visszaállási kinetikát meghatároztuk. A MARK alcsalád egymással közeli rokonságban álló három tagja gyorsította a TRESK áram visszaállást, vagyis a MARK1, MARK2 és MARK3 kinázok gátolják a TRESK csatornát (56.B és C ábra). A MARK4, AMPK $\alpha$ 1, NUA1, MELK és SIK1(1-343AA) kinázok koexpressziója nem befolyásolta szignifikáns mértékben a visszaállási kinetikát (56.B és C ábra).

A BRSK1 hatását a visszaállási kinetikára nem tudtuk biztosan megítélni, mert a BRSK1 koexpresszió teljesen kivédte a TRESK csatorna kalcium-függő aktivációját (56.D ábra). Ha az injektált BRSK1 cRNS mennyiséget csökkentettük (0.5 ng/sejt-ről 0.17ng/sejt-re) és ezzel lehetővé tettünk részleges kalcium-függő TRESK aktivációt, akkor ebből a kisebb aktivációból a normalizált visszaállás gyorsultnak tűnt (*az adatokat nem mutatom*). Habár a normalizált visszaállás szignifikánsan eltért a csak csatornát kifejező sejtekétől, az eredmény mégis bizonytalan a kiindulási aktiváció különböző nagysága miatt. Ennek megfelelően lehetséges, hogy a MARK1-3 kinázokon kívül a BRSK1 is foszforilálja a TRESK szerin klasztert, azonban ezen kívül biztosan kifejt másféle hatást is, amellyel gátolja a csatorna aktivációját. A BRSK1 kináz által kifejtett, TRESK csatorna kalcium-függő aktivációt gátló hatás mechanizmusát nem vizsgáltuk tovább [7].

Összefoglalva tehát, az S264 szabályozó aminosavat a PKA, a szerin klaszter régiót pedig a MARK1-3 kinázok foszforilálják a TRESK csatornában kísérletes körülmények között. A MARK kinázok erőteljes TRESK csatorna gátló hatást fejtenek ki és a PKA is valószínűleg gátolja a csatornát a 14-3-3 kötőhely foszforilációján keresztül. Mások RNS szekvenálás eredményei szerint, a PKA és MARK1-3 kifejeződik *Xenopus* petesejtben és hátsó gyöki, illetve trigeminális ganglion szenzoros neuronokban mRNS szinten, ezért a

MARK és PKA kinázok *in vivo* is hozzájárulhatnak a TRESK csatorna szabályozásához.

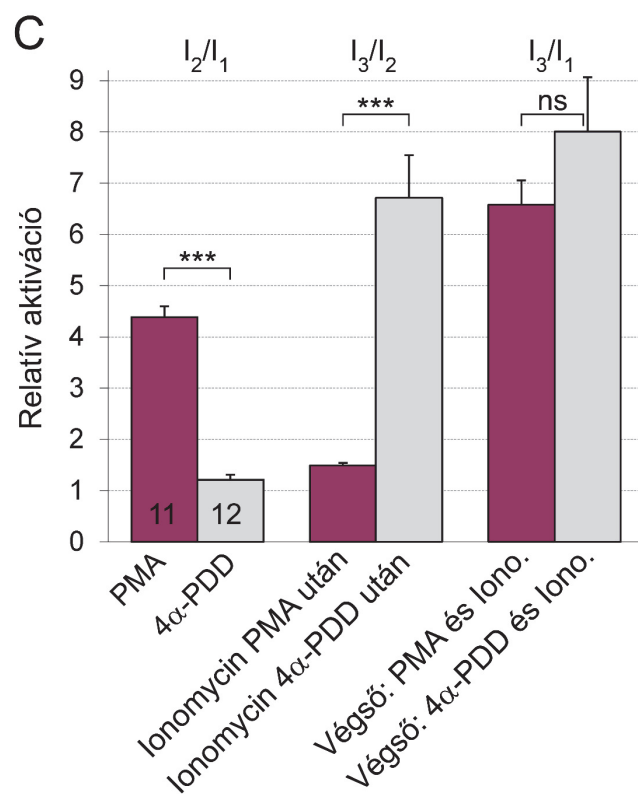
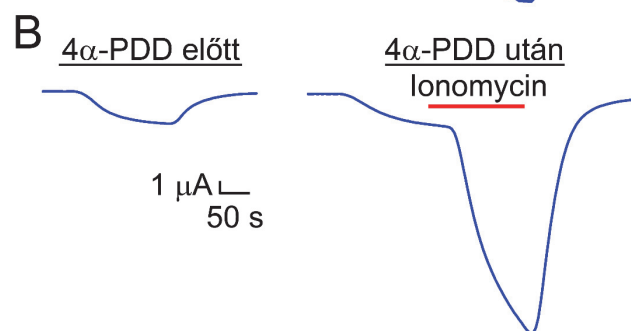
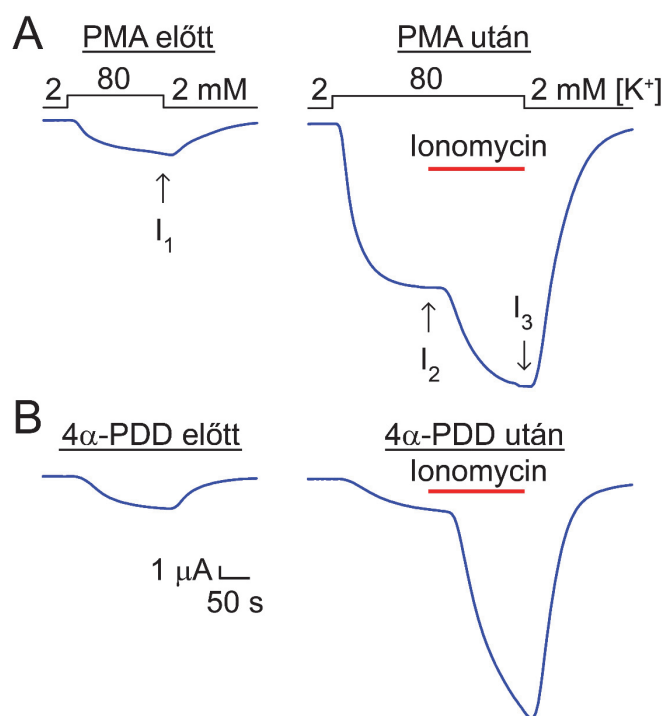
### 5.13 A PKC a szerin klaszter defoszforilációján keresztül hat

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  $3.1 \pm 0.2$ -szeres ( $n=7$ ) aktivációját hozza létre 30 perc alatt *Xenopus* petesejtekben [302]. A konvencionális PKC izoformákra specifikus aktivátor thymeleatoxin (TMX, 100 nM, 30 min) viszont egyáltalán nem befolyásolta a  $K^+$  áramot. A PMA által kiváltott TRESK aktiváció nem a kalcineurinon keresztül jön létre, mert a foszfatázt gátló ciklosporin A (1  $\mu$ M) nem csökkenti a PMA hatást. A humán TRESK csatornában található nyolc PKC foszforilációs konszenzus szekvencia mutációi nem változtatták meg a PMA hatására létrejövő TRESK aktivációt. Ezért Rahm A.K. és mtsai. arra a következtetésre jutottak, hogy a PKC egy olyan új ismeretlen mechanizmussal aktiválja a csatornát, amely független a TRESK közvetlen PKC általi foszforilációjától [302].

Felkeltette az érdeklődésemet, hogy hogyan működhet ez a kalcineurintól független TRESK aktivációs mechanizmus, ezért megkezdtük a TRESK és PKC interakciójának tanulmányozását farmakológiai és molekuláris biológiai módszerekkel. A PMA hatása a TRESK áramra reprodukálható volt a mi mérési körülményeink között is. A PMA egyértelműen növelte a humán TRESK  $K^+$  áramot, de a relatív aktiváció mértéke petesejt preparátumokként eltérőnek adódott, mintegy kétszeres, illetve több mint hatszoros között változott. Emiatt a kísérlettervezés során különös gondot fordítottunk arra, hogy lehetőség szerint egy preparátumból származó petesejt csoportok eredményeit hasonlítsuk össze. Az egér TRESK-re a PMA jóval kevésbé hatott, mint a humán csatornára (*az adatokat nem mutatom*) [303].

A PMA által kiváltott és a kalcium-függő aktivációs mechanizmusok viszonyának tisztázására, első tájékozódásként megvizsgáltuk, hogy a PMA-val létrehozott TRESK csatorna aktivációt követően, az ionomycin mekkora további  $K^+$  áram növekedést tud létrehozni (57. ábra) [303]. Ha a két mechanizmus teljesen független lenne, akkor előfordulhatna, hogy a PMA után az ionomycin

sokkal nagyobb végső aktivációt hoz létre, mint csak önmagában. Ellenkezőleg, ha a PMA után ugyanakkora aktiváció jön létre ionomycin hatására, mint PMA nélkül, akkor az inkább a két szabályozási mechanizmus összefüggését valószínűsíti.



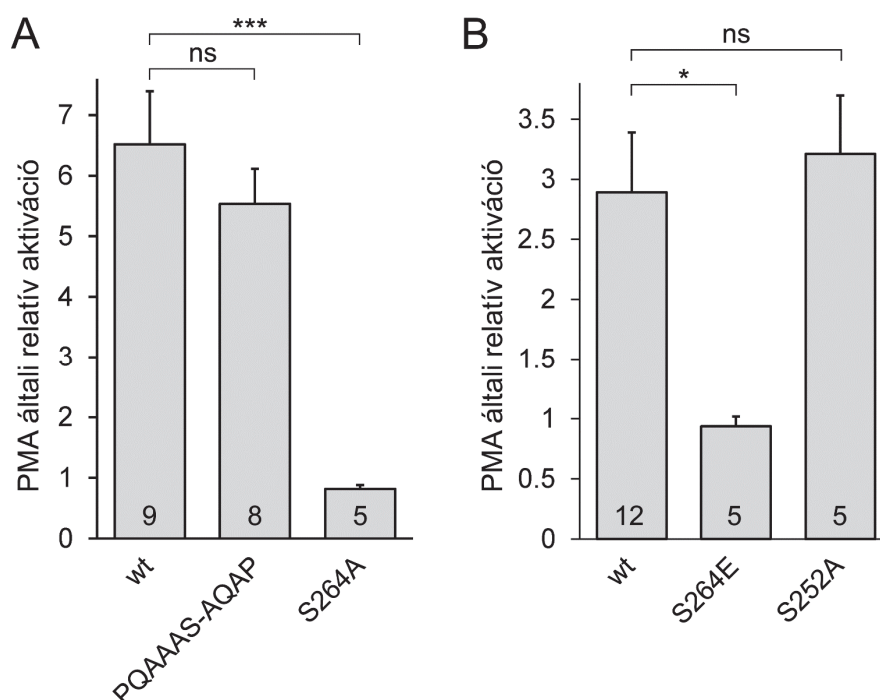
### 57. ábra: A TRESK áram ionomycin hatására létrejövő "végső" relatív aktivációjának mértéke megegyezik PMA és 4α-PDD előkezelés után

**A.** TRESK áramokat mértünk PMA (100 nM, 44-48 min) kezelés előtt (*bal oldali görbe*) és után (*jobb oldali görbe*). A PMA utáni mérés végén ionomycint adtunk (0.5 μM, 160 s, *piros*). A bazális TRESK áramot ( $I_1$ ), a PMA utáni áramot ( $I_2$ ) és az ionomycin utáni (végső) áramot ( $I_3$ ) *függőleges nyilak* jelölik. A görbék reprezentatív mérési eredményt mutatnak, humán TRESK csatornát kifejező petesejtből. **B.** A fenti kísérletet PMA helyett az inaktív analóg 4α-PDD (100 nM) adásával végeztük el egy másik petesejten. **C.** A PMA (*lila*) és 4α-PDD (*szürke*) által kiváltott TRESK aktiváció normalizált értékét kiszámítottuk ( $I_2/I_1$ ) az A és B paneleken illusztrált kísérletekből (*bal oszloppár*). Az ionomycin hatás megítélésére az ionofór adása előtti és utáni áramokat hasonlítottuk össze ( $I_3/I_2$ , *középső oszloppár*). A "végső" aktivációt az ionomycin utáni és a kiindulási áramok hányadosaként számítottuk ( $I_3/I_1$ , *jobb oszloppár*). A TRESK áram ugyanazt (a kb. 7-szeres) végső aktivációs szintet érte el PMA és 4α-PDD előkezelés után. (A számításoknál a 2 mM  $[K^+]$ -ban mért kis nonspecifikus (leak) áramokat levontuk az  $I_1$ ,  $I_2$  és  $I_3$  értékekből. \*\*\* $p < 0.0005$ , Mann-Whitney U test, Bonferroni korrekció nélkül; ns: nem szignifikáns.) Módosítva a [303] közleményből.

A PMA hatására létrejövő, több mint 30 percig tartó, lassú  $K^+$  áram növekedés folyamatos mérése két-elektrodos feszültségzárral nyilvánvalóan korlátozta volna a rendszerünk átbocsátó képességét, ezért más kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Minden petesejt  $K^+$  áramait kétszer mértük, egyszer a PMA kezelés előtt, illetve még egyszer PMA után. A két mérés között a sejtet eltávolítottuk a mérőkamrából és inkubáltuk forbol-észterben (100 nM, 44-48 min). Egy ilyen mérés regisztrátumai láthatók humán TRESK csatornát expresszáló petesejtből az 57. ábra A panelen. A TRESK áram nagyságát mértük PMA előtt ( $I_1$ ) és után ( $I_2$ ), -100 mV-on, extracelluláris oldatcsere (2 vs. 80 mM  $[K^+]$ ) segítségével, illetve a második mérés végén ionomycinnel kiváltottuk a csatorna kalcium-függő aktivációját és meghatároztuk a "végső"  $K^+$  áram nagyságát ( $I_3$ ). *Bal oldalon* a bazális TRESK áram látható, mellette *jobb oldalon* a PMA kezelés után mért áram és annak aktivációja ionomycin hatására (57.A ábra). A kontroll csoportban 4 $\alpha$ -forbol-12,13-didekanoáttal (4 $\alpha$ -PDD, 100 nM) kezeltük a sejteket az ionomycin adása előtt, olyan forbol-észter származékkal, amely nem hat a PKC-re (57.B ábra) [303].

A PMA mintegy négyszeresére növelte a TRESK áramot, az inaktív analóg 4 $\alpha$ -PDD viszont egyáltalán nem hatott (57.C ábra, *első oszloppár*). A PMA kezelés után az ionomycin még körülbelül másfélszeres  $K^+$  áram növekedést tudott létrehozni (57.C ábra, *harmadik oszlop*), ezáltal  $6.6 \pm 0.5$ -szörös "végső" aktiváció alakult ki a bazális áramhoz képest ( $n=11$ , 57.C ábra, *ötödik oszlop*). A kontroll sejtekben, a 4 $\alpha$ -PDD által nem változtatott bazális háttér  $K^+$  áramot az ionomycin arányában sokkal kifejezettebben növelte, mint a már részlegesen aktivált áramot a PMA-val kezelt sejtekben (57.C ábra, *középső oszloppár*). A kontroll csoportban ezáltal  $8.0 \pm 1.1$ -szeres "végső" aktiváció jött létre ( $n=12$ , 57.C ábra, *hatodik oszlop*). A PMA-val és 4 $\alpha$ -PDD-vel kezelt csoportokban az ionomycin adás utáni "végső" aktivációk nem különböztek szignifikánsan (57.C ábra, *jobb oszloppár*). Az ionomycin tehát a PMA után sem hozott létre magasabb szintű TRESK csatorna aktivációt, mint önmagában (vagyis az inaktív 4 $\alpha$ -PDD után alkalmazva). Ez felveti a lehetőségét, hogy a kalcium-függő és a PMA által kiváltott szabályozási mechanizmusok nem függetlenek egymástól [303].

A PMA általi és kalcineurin-függő TRESK aktivációs mechanizmusok összefüggésének további tanulmányozására olyan mutáns csatornákon vizsgáltuk a PMA hatását, amelyek kalcineurin-függő aktivációja eltérő okokból volt deficiens. Egyrészt megmértük, hogyan reagál a TRESK-PQAAAS-AQAP konstrukció árama a PMA-ra. Ebben a humán TRESK csatorna változatban a PQIIIS és LQLP kalcineurin-kötő motívumokat alanin cserékkel működésképtelenné tettük, ezért ez a mutáns egyáltalán nem mutat kalcium-függő aktivációt (ld. az 5.9 fejezetben, 35. ábra). A teljesen hiányzó kalcineurin-függő aktiváció ellenére, a TRESK-PQAAAS-AQAP konstrukció hasonlóan aktiválódott PMA hatására, mint a vad típusú csatorna (58. ábra, A panel, *bal oldali két oszlop*) [303].



**58. ábra: PMA hatására az PQAAAS-AQAP és S252A konstrukciók aktiválódnak, de az S264A és S264E mutánsok nem**

**A.** Humán vad típusú (*wt*), PQAAAS-AQAP mutáns vagy S264A mutáns TRESK csatornát kifejező petesejtekben megmértük a háttér  $K^+$  áram PMA-val kiváltott aktivációját. Az 57. ábrán ismertetett dupla méréses protokollt használtuk, de nem végeztünk ionomycinnel ingerlést. A két mérés között 42-46 percig inkubáltuk a sejteket PMA (100 nM) jelenlétében. A relatív aktivációt az 57.C panel bal oszlopánál bemutatott módon, mint  $I_2/I_1$  számítottuk. **B.** Egy másik petesejt preparátumban mértük a vad típusú (*wt*), S264E, illetve S252A mutáns csatornák áramának PMA hatására létrejövő változását. (Ebben a sejtpreparátumban a vad típusú TRESK kevésbé aktiválódott PMA hatására, mint az A panelen bemutatott kísérletben.) Az elemszámokat az oszlopokban tüntettük fel. \* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , Welch ANOVA majd Games-Howell teszt, ns: nem szignifikáns. Módosítva a [303] közleményből.

Ha a PQAAAS és AQAP mutációkkal megakadályoztuk a kalcineurin kapcsolódását a csatornához, a PMA akkor is változatlan mértékben létrehozta az aktiváló hatását. Ez megerősíti azt a következtetést, hogy a PKC nem a kalcineurinon keresztül aktiválja a TRESK csatornát. Ugyanezt a megállapítást még egy harmadik módon is alátámasztottuk. Ha a 22. ábrán bemutatott módon EGTA kalcium kelátort mikroinjektáltunk a petesejtekbe, a PMA akkor is ugyanúgy aktiválta a humán TRESK csatornát, mint EGTA nélkül (*az adatokat nem mutatom*). A PMA általi TRESK aktivációhoz tehát sem a citoplazma [ $\text{Ca}^{2+}$ ] növekedés, sem a kalcineurin aktiválódása nem szükséges [303].

Merőben eltérő eredmény adódott azonban, ha a PMA hatását olyan mutáns TRESK csatornán vizsgáltuk, amelyben a kalcineurin fő célpontját a "szerin klaszter" területén, az S264 aminosavat alaninra cseréltük. (A humán csatornában az S264 megfelel az egér csatorna S276 aminosavának a szerin klaszterben.) Az S264A mutáns csatorna konstitutívan aktív, mivel utánozza a defoszforilált állapotot a szabályozási szempontból elsődlegesen meghatározó régióban. A szerin klaszter foszforilációjának hiányában, az S264A mutáns bazális aktivitása magas és kalcineurinon keresztül gyakorlatilag nem aktiválható tovább. A TRESK S264A mutáns  $\text{K}^+$  árama egyáltalán nem növekedett PMA hatására, az áram  $0.82 \pm 0.07$ -szeresére változott ( $n=5$ , a csökkenés nem szignifikáns egymintás  $t$  teszttel, 58.A ábra, *harmadik oszlop*). A vad típusú TRESK csatorna többszörös  $\text{K}^+$  áram növekedése és az S264A mutáns PMA-ra adott válaszában teljes hiánya között a különbség egyértelmű ( $p<0.0005$ , 58.A ábra, *1. vs. 3. oszlop*) [303].

Megvizsgáltuk azt is, hogyan hat a PMA arra a mutáns TRESK csatornára, amelyben a 264-es szerint nem alaninnal, hanem az aminosav foszforilált állapotát utánzó, negatív töltésű glutamáttal helyettesítettük. A PMA egyáltalán nem aktiválta az S264E mutáns TRESK csatornát sem ( $0.94 \pm 0.08$ -szoros áram változás,  $n=5$ , az áram állandó maradt, 58.B ábra, *második oszlop*). A különbség szignifikánsnak bizonyult a vad típusú csatornával összehasonlítva ( $2.9 \pm 0.5$ -szörös aktiváció,  $n=12$ ,  $p<0.01$ , 58.B ábra). Tehát mindegy, hogy az S264-et alaninnal vagy glutamáttal helyettesítjük, amennyiben az S264-es pozícióban mutációval megakadályozzuk a csatorna

foszforiláció-függő szabályozását, akkor ez kivédi a PKC általi TRESK aktivációt [303].

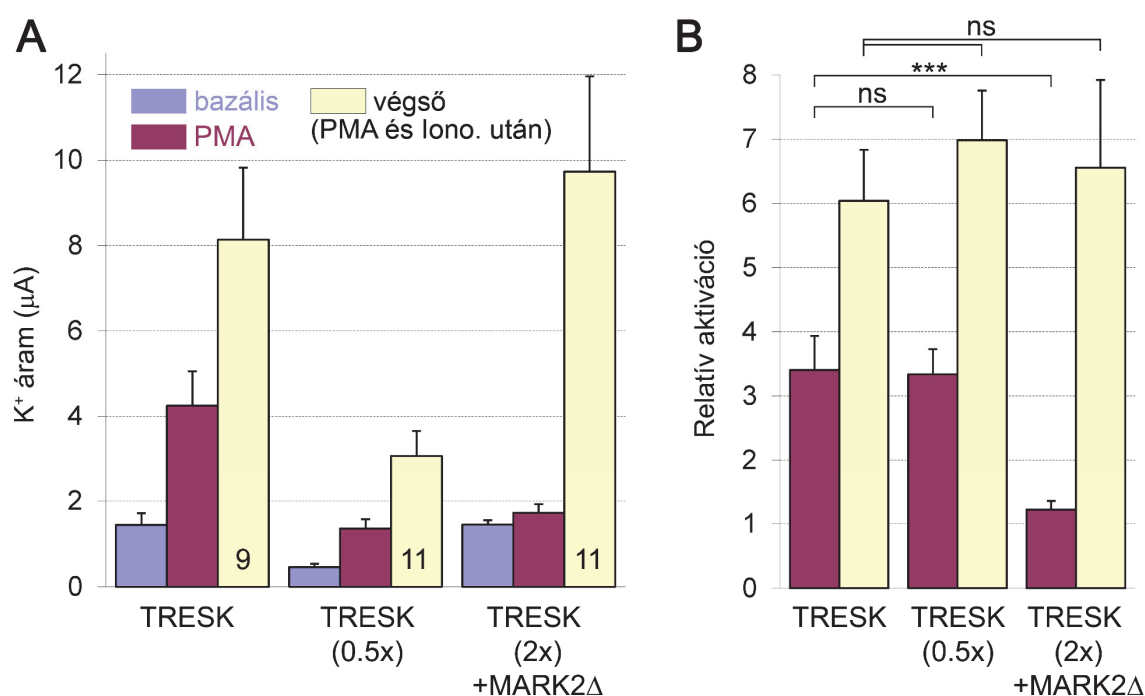
Szemben a szerin klaszter mutációjával, az S252 szabályozó szerin alaninra cserélése nem befolyásolta a PMA hatását ( $3.2 \pm 0.5$ -szörös aktiváció,  $n=5$ , 58.B ábra, 1. vs. 3. oszlop). (A humán TRESK-ben az S252 megfelel az egér csatorna S264 aminosavának, amely a csatorna 14-3-3-kötéséért is felelős). A mutáció hatástalansága valószínűsíti, hogy az S252 aminosav nem vesz részt a PKC-függő TRESK aktiváció kialakításában [303].

Mivel az S264 mutációk kivédtek a PMA általi TRESK aktivációt, felmerült a lehetősége, hogy a PKC is a szerin klaszter foszforilációs állapotának változtatásán keresztül szabályozza a csatornát. Ha ez így van és a PKC közvetett módon szerin klaszter defoszforilációt idéz elő, akkor ezt ellensúlyozni lehet egy olyan kináz koexpressziójával, amely a szerin klasztert közvetlenül foszforilálja. Az 5.12 fejezetben ismertetett eredmények szerint erre alkalmas a MARK2 kináz. Ennek a hipotézisnek megfelelően, meglepő módon tehát az várható, hogy az egyik kináz (PKC) csatornára kifejtett hatását egy másik kináz koexpressziójával (MARK2) tudjuk megakadályozni [303].

Eltávolítottuk a MARK2 C-terminális szabályozó régióját, előállítottuk a MARK2 $\Delta$  konstrukciót, amely csonkolt a 361-es aminosavnál és nem gátlódik az új típusú (novel-type) PKC enzimek hatására [304]. Ha a MARK2 $\Delta$  konstrukciót koexpresszáltuk a TRESK csatornával, akkor a PMA nem hozott létre csatorna aktivációt (59. ábra).

Ebben a kísérletben az 57.A ábrán bemutatott módszert alkalmaztuk. Először a TRESK nyugalmi áramát mértük, majd PMA (100 nM) jelenlétében inkubáltuk a sejteket és ezt követően újra megmértük a TRESK áram nagyságát, végül ionomycinnel kiváltottuk a "végső" maximális aktivációt. A MARK2 $\Delta$  koexpressziója a TRESK csatornával teljesen kivédte a PMA háttér K<sup>+</sup> áram növelő hatását (59.B ábra, *lila oszlopok*). A MARK2 $\Delta$ -t kifejező csoportban az áram elhanyagolható mértékben, csak  $1.2 \pm 0.2$ -szeresére növekedett PMA hatására (TRESK(2x)+MARK2 $\Delta$ ,  $n=11$ , 59.B ábra, *jobb lila oszlop*). A csak csatornát kifejező kontroll csoportban a PMA  $3.4 \pm 0.5$ -szörös aktivációt okozott (TRESK,  $n=9$ , 59.B ábra, *bal lila oszlop*). A másik kontroll csoportban,

amelyben a csatorna kifejeződését feleannyi TRESK cRNS injektálásával hoztuk létre, a  $K^+$  áram  $3.3 \pm 0.4$ -szeresére növekedett PMA hatására (TRESK 0.5x, n=11), ami jól mutatja, hogy a csatorna kifejeződésének mértéke nem befolyásolta a relatív aktiváció nagyságát. A PMA általi TRESK aktiváció a MARK2 $\Delta$ -t is kifejező sejtekben, mindkét kontroll csoporthoz viszonyítva, szignifikáns kisebb volt ( $p < 0.001$ , 59.B ábra, *lila oszlopok*) [303].



**59. ábra: A MARK2 $\Delta$  koexpressziója a humán TRESK csatornával kivédi a PMA aktiváló hatását**

**A.** Az átlagos bazális TRESK áramot (*világoskék*), a PMA kezelés utáni áramot (*lila*) és az ionomycin adást követő "végső"  $K^+$  áramot ábrázoltuk, amelyek megfelelnek az  $I_1$ ,  $I_2$  és  $I_3$  áramoknak az 57.A ábrán bemutatott mérési protokoll szerint. Egy preparátumból származó petesejtek három csoportját vizsgáltuk. Az első csoportban kifejeztük a humán TRESK csatornát (TRESK), a másodikban kisebb TRESK expressziót hoztunk létre feleannyi cRNS injektálásával (TRESK 0.5x), a harmadikban pedig kétszeres TRESK cRNS mennyiséggel együtt adtuk a MARK2 $\Delta$  cRNS-t (TRESK(2x)+MARK2 $\Delta$ ), ahogy azt az *oszlophármasok* alatt jelöltük. **B.** Az A panelen bemutatott adatokból kiszámítottuk a TRESK áram relatív aktivációját PMA hatására (*lila*,  $I_2/I_1$  az 57.C szerint) és az ionomycin utáni "végső" aktiváció mértékét (*sárga*,  $I_3/I_1$  a 57.C szerint). A MARK2 $\Delta$  jelenlétében a PMA általi TRESK aktiváció nem jött létre (*lila oszlopok*), azonban az ionomycin hatását nem befolyásolta a kináz koexpressziója (*sárga oszlopok*). \*\*\* $p < 0.001$ , MANOVA, majd Tukey HSD teszt; ns: nem szignifikáns. Módosítva a [303] közleményből.

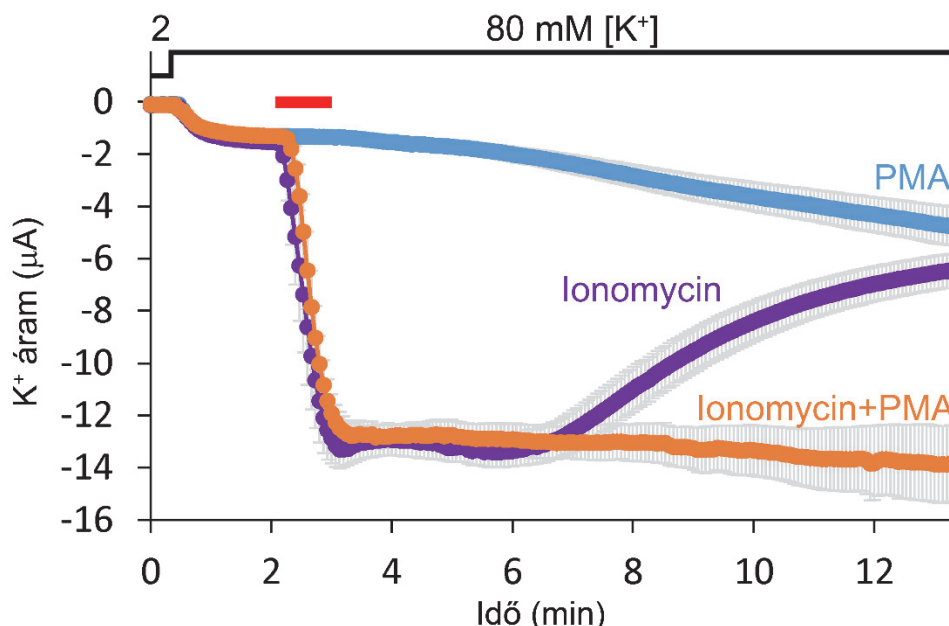
A MARK2 $\Delta$  koexpressziója teljesen kivédte a PMA hatását, azonban nem befolyásolta a "végső" aktiváció mértékét az ionomycin adását követően, a kísérlet végén. A TRESK csatorna a MARK2 $\Delta$  kináz jelenlétében  $6.6 \pm 1.4$ -szeresre aktiválódott (*TRESK(2x)+MARK2 $\Delta$* ), 59.B ábra, *jobb sárga oszlop*), ugyanolyan mértékben, mint a csak csatornát expresszáló kontroll csoportokban ( $6.0 \pm 0.8$ -szoros aktiváció a *TRESK* és  $7.0 \pm 0.8$ -szoros a *TRESK (0.5x)* csoportokban, 59.B ábra, *bal és középső sárga oszlopok*). A MARK2 $\Delta$  koexpressziója a TRESK csatornával fenntartotta a szerin klaszter foszforilációját és ezzel ellensúlyozta a PMA által létrehozott gyenge defoszforilációt, azonban nem tudta megakadályozni csatornához közvetlenül kötődő kalcineurin fékezhetetlen foszfatáz hatását [303].

(Egy másik hasonló kísérletben, a MARK2 $\Delta$  cRNS-sel együtt ugyanannyi TRESK cRNS-t injektáltunk, mint a csak csatornát kifejező kontroll csoportban. A MARK2 $\Delta$  koexpressziója ebben a kísérletben is teljesen kivédte a PMA hatását, azonban a bazális áram a MARK2 $\Delta$ -t is kifejező csoportban kisebb volt, mint a kontrollban (*az adatokat nem mutatom*).)

A TRESK áram visszatérése a kiindulási állapotba a kalcium-függő aktivációt követően a szerin klasztert (S262-267) foszforiláló kináz(ok) működésének következménye. A PMA hatását ezekre a kinázokra úgy vizsgáltuk, hogy az ionomycinnel kiváltott TRESK aktivációt követő K<sup>+</sup> áram visszaállási kinetikát meghatároztuk. A TRESK csatornát expresszáló petesejteket csak ionomycinnel (0.5  $\mu$ M), vagy ionomycinnel és PMA-val (100 nM) együtt ingereltük (*piros vastag vonal*), majd a két csoportban összehasonlítottuk a TRESK áram visszatérését a nyugalmi (gátolt) állapotba (60. ábra, *lila és narancssárga görbék*) [303].

A kalcium-függő aktiváció végén mért áram maximumok megegyeztek az ionomycinnel ( $12.5 \pm 1.1 \mu$ A, n=5) és az ionomycin+PMA kombinációval ingerelt csoportban ( $11.5 \pm 0.8 \mu$ A, n=5). A csak ionomycinnel kezelt sejtekben a TRESK áram elkezdett visszatérni a kiindulási érték felé,  $6.5 \pm 0.6 \mu$ A nagyságúra csökkent a mérés végén (60. ábra, *lila görbe*). Az ionomycin+PMA csoportban viszont egyáltalán nem csökkent a K<sup>+</sup> áram,  $13.8 \pm 1.4 \mu$ A nagyságú maradt a mérés végén (60. ábra, *narancssárga görbe*,  $p < 0.002$ ,

Student t-teszt). Az ionomycin+PMA csoportban tapasztalt visszaállási sebesség csökkenés alátámasztja azt a következtetést, hogy a TRESK csatornát foszforiláló kináz gátlódik a PMA hatására.



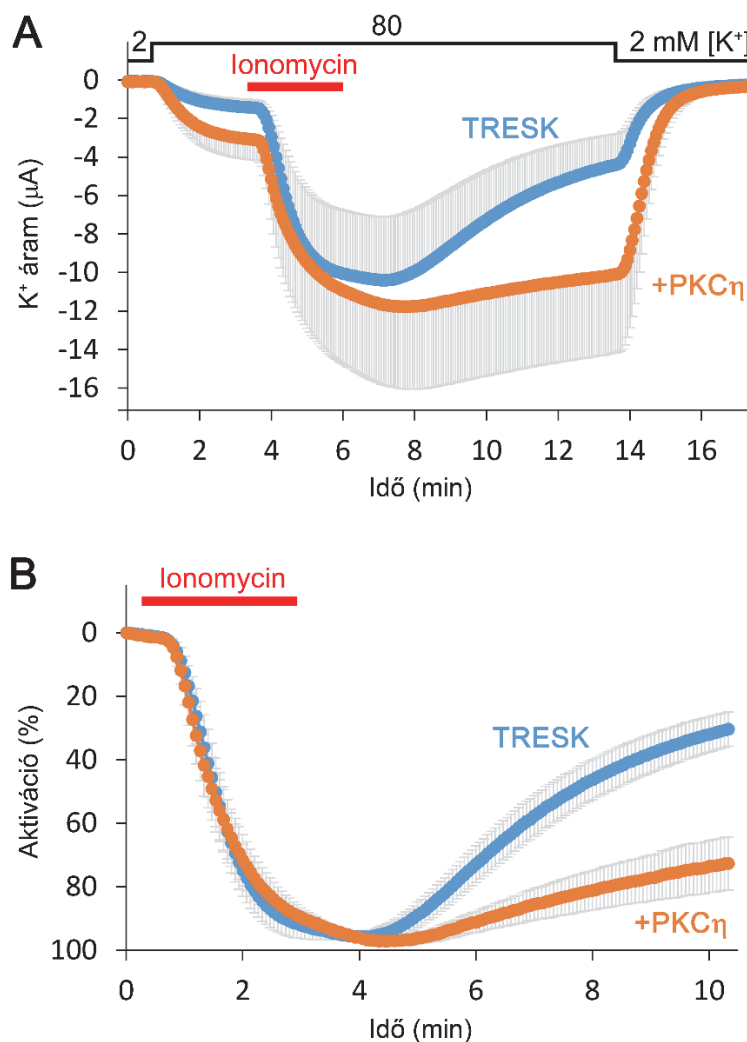
**60. ábra: Az ionomycinnel és PMA-val végzett kombinált ingerlést követően a TRESK áram visszatérése a nyugalmi állapotba elmarad**

Humán TRESK csatornát expresszáló petesejteket ionomycinnel (0.5  $\mu$ M, *lila*), ionomycin+PMA (100 nM) kombinációjával (*narancssárga*), vagy csak PMA-val (*világoskék*) ingereltünk, a vastag *piros* vonallal jelzett időtartamban ( $n=5$  mindhárom csoportban, a szórást (S.E.) *szürkével* jelöltük). Az áramokat a 20. ábrán bemutatott módszerrel mértük. Ha az ionomycin mellett PMA-t is adtunk a rövid ingerlés során, akkor a TRESK áram visszatérése a nyugalmi állapot irányába elmaradt (*narancssárga görbe*). (A csak PMA-val kezelt sejtek lassú áram növekedését csak tájékoztatásul ábrázoltuk, ezzel statisztikai kiértékelést nem végeztünk.) Módosítva a [303] közleményből.

Megklónoztuk az új (novel) típusú PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  és PKC $\theta$  izoformákat egér agyból és koexpresszáltuk ezeket a TRESK csatornával. A PKC $\theta$  nem, a PKC $\delta$  pedig kis mértékben változtatta a TRESK áram szabályozást (*az adatokat nem mutatom*), ezért a továbbiakban a PKC $\eta$  és PKC $\epsilon$  izoformákkal foglalkoztunk, amelyek erősen hatottak a TRESK áramra.

A TRESK csatornát és PKC $\eta$ -t koexpresszáló sejtekben  $3.0 \pm 1.0$   $\mu$ A volt a bazális áram átlagos nagysága ( $n=5$ ), amíg a TRESK csatorna expressziója önmagában  $1.4 \pm 0.4$   $\mu$ A alapáramot hozott létre ugyanabban a

sejtpreparátumban ( $n=7$ ). A bazális áramok átlagában mutatkozó mintegy kétszeres különbség ellenére, a TRESK expressziós szintjének nagy szórása miatt a két csoport adatainak eltérése nem volt szignifikáns (61. ábra, A panel, *világoskék* és *narancssárga* görbék, ld. az áramokat az ionomycin adása előtt).



**61. ábra: A PKC $\eta$  koexpressziója lassítja a TRESK áram visszaállását a kiindulási állapotba a kalcium-függő aktivációt követően.**

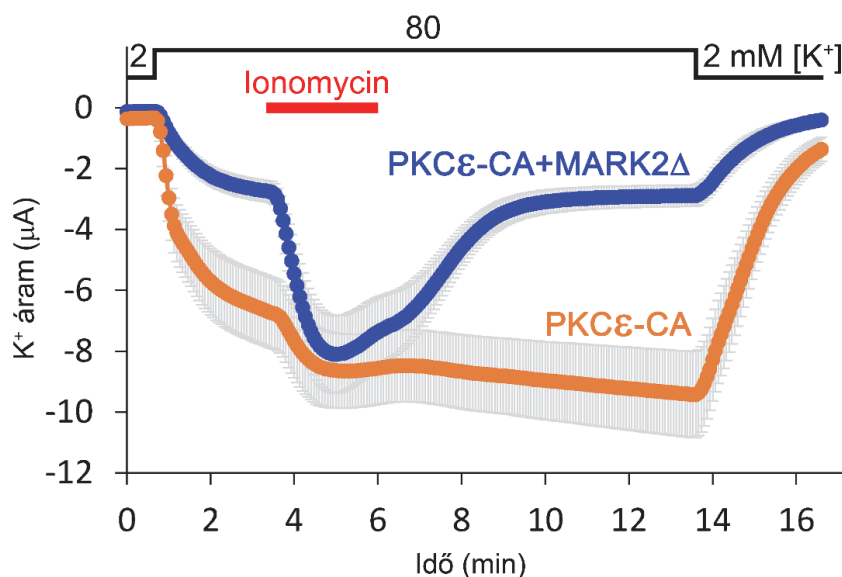
**A.** A humán TRESK csatornát kifejező (*TRESK*, *világoskék*,  $n=7$ ), vagy TRESK csatornát és PKC $\eta$  kinázt koexpresszáló (*PKC $\eta$* , *narancssárga*,  $n=5$ ) sejtekben mért  $K^+$  áramok átlagát ábrázoltuk. A petesejteket ionomycinnel ( $0.5 \mu M$ ) ingereltük (*pirosvonal*). Csak pozitív vagy negatív irányban jelöltük a szórásokat (szürke, S.E.). **B.** Az aktiváció mértékét százalékban fejeztük ki az A panelen bemutatott adatokból úgy, hogy a bazális  $K^+$  áramot 0 % aktivációnak tekintettük, az ionomycin után mért legnagyobb áramot pedig 100 %-nak. A normalizálás jelentősen csökkentette a szórást az A panel áram adataihoz képest, amelyeknél a petesejtenkénti variabilitást elsősorban a különböző TRESK expressziós szint okozta. A PKC $\eta$  koexpresszió kifejezetten lassította a TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba. Módosítva a [303] közleményből.

Habár a bazális áramok különbsége nem volt szignifikáns, az áram ionomycin hatására kialakuló növekedése jóval kisebb volt a PKC $\eta$ -t és TRESK csatornát koexpresszáló sejtekben ( $4.2 \pm 0.6$ -szoros relatív aktiváció,  $n=5$ ), mint azokban, amelyek csak a csatornát expresszálták ( $7.3 \pm 0.3$ -szoros változás,  $n=7$ ,  $p<0.001$ , Student t-teszt). Ez a PKC $\eta$  hatására csökkent relatív aktiváció, együtt a közelítőleg megegyező maximális áram amplitúdókkal (61.A ábra) azt sugallja, hogy az ionomycin adása előtt mért "nyugalmi" TRESK áram mégiscsak aktiválódott a PKC $\eta$  koexpresszió miatt [303].

A TRESK áram visszatérése a kiindulási állapotba jelentősen lelassult a PKC $\eta$ -t koexpresszáló sejtekben. A kontroll, TRESK csatornát kifejező csoportban a visszaállás kifejezett volt, a mérés végén a maximális aktivációs értéknek csak  $30 \pm 5$  %-a maradt fenn (61.B ábra, *TRESK*, világoskék görbe). A TRESK-et PKC $\eta$ -val koexpresszáló sejtekben viszont az áram még  $73 \pm 8$  %-ban aktivált maradt a mérés végén (+PKC $\eta$ , *narancssárga* görbe,  $p<0.001$ , Student t-teszt). Ez azt mutatja, hogy a PKC $\eta$  erőteljesen csökkentette a TRESK kalcineurin-függő aktiváció utáni gátló foszforilációját. A PKC $\eta$  koexpresszió folytán megnövekvő "nyugalmi" TRESK aktivitás, illetve az áram visszaállás lassulása a kalcium-függő aktiváció után egybehangzó a PMA kezeléssel kapott eredményekkel (60. ábra). Az új (novel) típusú PKC a TRESK csatornát foszforiláló kináz gátlásával vesz részt a szabályozásában.

A fenti következtetéseket több független kísérlettel megerősítettük, illetve kiegészítettük. Szintén szignifikánsan csökkentette a visszaállási sebességet a PKC $\varepsilon$  koexpressziója a humán TRESK csatornával. Ugyanezt a hatást viszont nem fejtette ki azonos körülmények között a PKC $\varepsilon$  K437R mutáns változata, amelyben a kináz domént inaktívtuk az irodalmi adatoknak megfelelően [305]. Így tehát a PKC $\eta$ -n kívül a PKC $\varepsilon$  is szabályozza a TRESK áramot és a kináz aktivitás a hatáshoz elengedhetetlen. A PKC $\varepsilon$  lassította az S252A mutáns humán TRESK csatorna kalcium-függő aktiváció utáni áram visszaállását is. Vagyis, csakúgy mint azt a PMA-val végzett kísérletben tapasztaltuk (58.B ábra, *jobb oldali oszlop*), az RSN $\underline{S}$ CP szabályozó (14-3-3-kötő) régió nem szükséges a PKC koexpresszió hatásához sem (*az adatokat nem mutatom*) [303].

Kíváncsiak voltunk, hogy a PMA-éhoz hasonlóan (59. ábra), a PKC koexpresszió hatását is visszajára fordítja-e a MARK2 $\Delta$  koexpresszió. Hogy a kísérletben minél kifejezettebb PKC hatást érjünk el, a PKC $\epsilon$  A159E mutáns konstitutívan aktív változatát (PKC $\epsilon$ -CA) használtuk, amelyben negatív glutamátra cseréltük a pszeudoszubsztrát motívumban található alanint [305]. Azt vizsgáltuk, hogy a MARK2 $\Delta$  konstrukcióval stabilizált szerin klaszter foszforiláció képes-e kivédeni a konstitutívan aktív PKC $\epsilon$  A159E mutáns TRESK aktiváló hatását (62. ábra) [303].



**62. ábra: A MARK2 $\Delta$  ellensúlyozza a konstitutívan aktív PKC $\epsilon$  hatását, csökkenti a nyugalmi TRESK aktivitást és felgyorsítja a K $^{+}$  áram visszaállást a kalcium-függő aktiváció után**

A *Xenopus* petesejtek egyik csoportja a humán TRESK csatornával koexpresszálta a konstitutívan aktív PKC $\epsilon$  A159E mutánst (PKC $\epsilon$ -CA, narancssárga,  $n=10$ ). A másik csoportban a sejtek a TRESK és PKC $\epsilon$ -CA mellett koexpresszálták a MARK2 $\Delta$ -t is (háromszoros koexpresszió, PKC $\epsilon$ -CA+MARK2 $\Delta$ , kék,  $n=9$ ). Az ionomycinnel (0.5  $\mu$ M, *piros vonal*) végzett ingerlés közben és után mért K $^{+}$  áramok átlagát ábrázoltuk oly módon, mint a 61.A ábrán. A MARK2 $\Delta$  csökkentette az ionomycin adása előtt mért bazális áramot, de az ionomycin hatására aktiválódó áramok maximuma megegyezett a két csoportban. A MARK2 $\Delta$  hatására drámaian felgyorsult a TRESK áram visszatérése a kiindulási állapotba az ionomycin elvonása után. Módosítva a [303] közleményből.

A bazális K $^{+}$  áram átlaga  $6.5 \pm 1.2$   $\mu$ A volt a TRESK csatornát és konstitutívan aktív PKC $\epsilon$ -t koexpresszáló sejtekben ( $n=10$ , 62. ábra, PKC $\epsilon$ -CA, narancssárga görbe). Erről a magas bazális értékről az ionomycin csak egészen kis mértékben növelte tovább a K $^{+}$  áramot. Ha viszont a sejtek a

MARK2 $\Delta$  kinázt is koexpresszálták a TRESK és konstitutívan aktív PKC $\epsilon$  mellett, akkor a bazális áram mindössze  $2.6 \pm 0.6$   $\mu$ A nagyságúnak adódott ( $n=9$ ,  $p<0.01$ , heteroszkedasztikus t-teszt, 62. ábra, *kék PKC $\epsilon$ -CA+MARK2 $\Delta$  görbe*, ionomycin adása előtt). A szignifikánsan kisebb bazális árammal összhangban, az ionomycinnel kiváltott aktiváció a MARK2 $\Delta$ -t is kifejező sejtekben ( $3.2 \pm 0.3$ -szoros áram növekedés) jóval meghaladta a csak TRESK-et és PKC $\epsilon$ -t koexpresszáló sejtekből meghatározott értéket ( $1.5 \pm 0.1$ -szeres relatív aktiváció, 62. ábra,  $p<0.002$ , heteroszkedasztikus t-teszt). Így végeredményben kb. ugyanakkora maximális áramok alakultak ki a két csoportban [303].

A MARK2 $\Delta$  koexpresszió ezenfelül teljesen nyilvánvaló módon felgyorsította a TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba az ionomycin elvonása után. A csak TRESK-et és konstitutívan aktív PKC $\epsilon$ -t koexpresszáló csoportban az áram egyáltalán nem közelített a kiindulási állapot irányába a mérés időtartamában. Ha az ionomycin adás végén meghatározott aktiváltsági szintet vesszük 100%-nak, akkor a mérés végén az aktivitás  $154 \pm 25$  %-os átlagot ért el. Ezzel éles ellentétben, a MARK2 $\Delta$  az áram teljes visszaállását hozta létre hozzávetőlegesen 5 percen belül, az aktiváció  $9 \pm 5$  %-a maradt fenn a mérés végén ( $p<0.0005$ , Mann-Whitney U teszt, 62. ábra, *kék görbe*).

Összefoglalva tehát, a konstitutívan aktív PKC $\epsilon$  koexpressziója erőteljesen növelte a TRESK csatornák áramát nyugalmi körülmények között. A csatornák jelentős hányada a kiindulási helyzetben defoszforilált állapotban lehetett, ezért az ionomycinnel kiváltott kalcineurin aktiváció is csak másfélszeresére tudta tovább növelni az áramot. Az ionomycin elvonását követő áram visszaállítás rendkívülien lelassult, mert a PKC $\epsilon$  erősen gátolta a szerin klasztert foszforiláló endogén kinázt [303].

A MARK2 $\Delta$  hatására szignifikánsan csökkent a bazális áram és az ionomycinnel kiváltott relatív aktiváció fokozódott, mely eredmények egymást erősítve igazolják, hogy a MARK2 $\Delta$  ellensúlyozta a PKC $\epsilon$  csatornaaktiváló hatását nyugalmi körülmények között. A PKC $\epsilon$  hatása iránt érzéketlenné tett MARK2 $\Delta$  helyreállította a szerin klaszter bazális foszforilációját és a TRESK

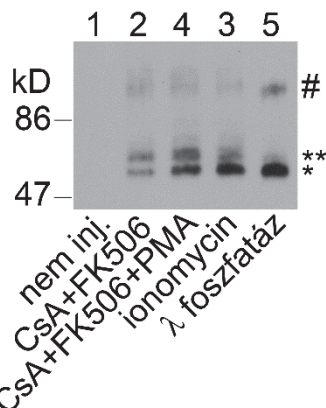
nyugalmi gátolt állapotát, illetve nagyobb ionomycin általi aktivációt tett lehetővé. Mindemellett a MARK2Δ felgyorsította az áram visszaállását a kalcium-függő aktiváció után, mivel a PKC $\epsilon$  által gátolt endogén kinázt helyettesítette és elősegítette a TRESK visszafoszforylálódását az ionomycin hatására létrejövő defoszforylációt követően [303].

Funkcionális eredményeink biokémiai megerősítésére célul tűztük ki a teljes csatornafehérje kalcium-függő és PMA által kiváltott *in vivo* defoszforylációjának kimutatását *Xenopus* petesejt plazmamembrán preparátumból. Ehhez a Phos-tag™ SDS-PAGE módszert használtuk (Wako Pure Chemical Industries, Osaka). Az SDS-PAGE gél mátrixba kovalensen kötött Phos-tag™ reagens Zn<sup>2+</sup> komplexe reverzibilisen köti a foszoproteinek foszfát csoportját, ezáltal csökkenti azok mobilitását az elektroforézis folyamán a defoszforylált fehérjéhez képest. A Phos-tag gélen szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk és a HA<sub>2</sub>-N70Q-hTRESK eltérően foszforylált formáit anti-HA immunoblot módszerrel jelenítettük meg. (Az N70Q mutációval kivédtük az N-glikozilációból adódó TRESK molekulásúly heterogenitást, a dupla influenza hemagglutinin epitóp címke pedig megfelelő intenzitású jelet biztosított az immunoblot során.) Valószínűleg az elsők között vállalkoztunk csatornafehérje foszforyláció kimutatására Phos-tag SDS-PAGE módszerrel. A Phos-tag módszer alkalmasnak bizonyult a TRESK *in vivo* defoszforylációjának vizsgálatára (63. ábra), azonban az eljárással kapcsolatban nem várt anomáliákra is fény derült.

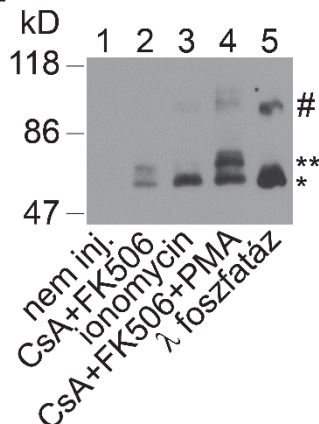
A TRESK bazális foszforylációjának megfelelő negatív kontroll csoportban, a HA<sub>2</sub>-N70Q-hTRESK konstrukciót kifejező petesejteket 45 percig inkubáltuk ciklosporin A (CsA, 1  $\mu$ M) és FK506 (1  $\mu$ M) kalcineurin gátlószerek jelenlétében. Az ezekből származó a (nagyobbrészt) foszforylált TRESK fehérje két halvány csík formájában jelent meg a Phos-tag gél elektroforézis utáni Western blot képeken (CsA+FK506, 2. sáv az A1-3 képeken, 63. ábra). Az alsó csík (\*) a preparátumban található kis mennyiségű defoszforylált TRESK-nek felel meg, a felső csík (\*\*) pedig a foszforylált formának. Ha ugyanilyen petesejtekből ugyanekkora mennyiségű TRESK fehérjét *in vitro*

15  $\mu$ M Phos-tag

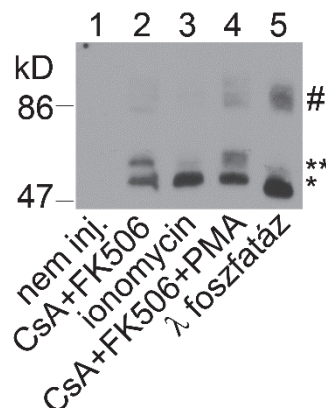
A1



A2

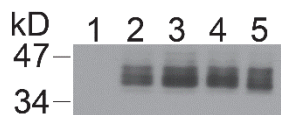


A3

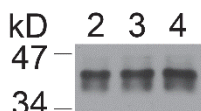


## Phos-tag nélkül

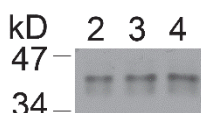
B1



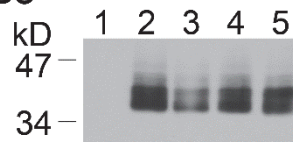
B2a



B2b



B3



**63. ábra: A humán TRESK fehérje kalcium-függő és PMA hatására létrejövő defoszforilációjának kimutatása Phos-tag SDS-PAGE módszerrel és anti-HA immunoblottal**

**A1-A3.** Az N70Q mutáns, dupla HA-címkével jelölt humán TRESK csatornát kifejező petesejteket ciklosporin A (CsA, 1  $\mu$ M) és FK506 (1  $\mu$ M) jelenlétében inkubáltuk 45 percre (2-es jelű sávok), vagy ionomycinnel (1  $\mu$ M) három percre (3-as sávok), vagy PMA-val (100 nM) 45 percre CsA és FK506 jelenlétében (4-es sávok). Az oocyták egy másik CsA+FK506-tal kezelt csoportjából (úgy kezelve, mint a 2-es sávban) származó plazmamembrán fehérjéket *in vitro* defoszforiláltuk  $\lambda$  foszfataázal (5-ös sávok). Abszolút negatív kontrollként, az anti-HA Western blot specificitásának ellenőrzésére, CsA+FK506-tal kezelt nem-injektált petesejteket használtunk (1-es sávok). A petesejt csoportokból plazmamembrán frakciót izoláltunk és a fehérjéket 15  $\mu$ M Phos-tag reagenst és 45  $\mu$ M  $Zn^{2+}$ -et tartalmazó 8 %-os SDS-PAGE gélen választottuk szét. A gélkészítéshez és elektroforézishez a neutrális Tris-MOPS puffer rendszert használtuk. A defoszforilált TRESK proteint csillaggal (\*), a foszforilált TRESK fehérjék területét dupla csillaggal (\*\*), a TRESK dimert pedig kettőskereszttel (#) jelöltük. A TRESK foszforiláció állapotát három független reprezentatív kísérletben mutatjuk és minden kísérletben öt egyenlő elemszámú *Xenopus* oocyta csoportot használtunk ( $n = 11, 34$ , és 26 csoportonként a három kísérletben, A1-A3, rendre). A 3-as és 4-es mintákat fordított sorrendben vittük fel a géltre az A1 kísérletben. **B1-B3.** Ugyanazokat a mintákat, mint az A1-A3 paneleken, hagyományos SDS-PAGE géleken futtattuk, Phos-tag reagens nélkül, majd anti-HA Western blot segítségével összehasonlítottuk a teljes (foszforilált+defoszforilált) TRESK fehérjék mennyiségét a mintákban. A B2a és B2b paneleken ugyanannak a membránnak a képét mutatjuk hosszabb és rövidebb expozíciós idővel. A B1 és B3 paneleken a Tris-MOPS puffer rendszert használtuk, a B2 paneleken pedig a hagyományos Tris-Gly rendszert.

defoszforiláltunk  $\lambda$  foszfatázzal (defoszforilált pozitív kontroll), akkor egy nagyon intenzív alsó csíkot kaptunk eredményül ( $\lambda$  foszfatáz, 5. sáv az A1-3 képeken, 63. ábra). Ebből egyértelműen következik, hogy a foszforilált TRESK csatornát a Phos-tag módszer sokkal alacsonyabb hatásfokkal mutatja ki, mint a defoszforilált fehérjét. Emiatt a Phos-tag gélen, az ugyanannyi (foszforilált+defoszforilált) "TRESK összfehérjét" tartalmazó egyes sávokban, a csíkok összegzett intenzitása nem állandó, a foszforiláltabb mintákban (pl. 2. sáv) kisebb, mint a defoszforiláltban (pl. 5. sáv). Ráadásul a foszforilált fehérjék detektálási hatásfoka függhet a foszforiláció mértékétől és pozíciójától. A Phos-tag eredmények csak ezeknek a következtetéseknek tudatában értékelhetők helyesen [303].

A fenti okok miatt a foszforilált fehérjék csíkjai kvantitatív vizsgálatra csak igen korlátozottan alkalmasak (pl. esetleg olyan halványak lehetnek, hogy nem is látszanak). Ezért a Phos-tag eredmények kiértékelésénél a defoszforilált fehérjének megfelelő alsó csíkból indultunk ki, amely jobban értékelhető. Arra törekedtünk, hogy az egyes sávokban ugyanannyi (foszforilált+defoszforilált) "TRESK összfehérje" legyen (a különböző módon, rövid ideig kezelt csoportok egyenlő számú, ugyanúgy expresszázó petesejtből indultak ki). A Phos-tag kísérlet során az alsó csík intenzitását vizsgáltuk, amelynek csökkenése foszforiláltabb mintának, a növekedése pedig a defoszforilációnak felelt meg. Tehát a Phos-tag gélnek lényegében csak azt a tulajdonságát használtuk ki, hogy csökkenti a foszforilált TRESK elektroforetikus mobilitását és ezáltal "kivonja" a foszforilált fehérje mennyiséget az alsó csíkból. (Nem törődtünk viszont azzal, hogy az egyes foszforilált TRESK változatok hogyan terülnek szét a gélben és mekkora hatásfokkal jelennek meg.) Hagyományos SDS-PAGE futtatást követő Western blot leképezéssel utólag is ellenőriztük, hogy az egyes (egyenlő számú petesejt csoportokból származó) mintákban a TRESK összfehérje mennyiség tényleg megegyezik (63. ábra, B1-B3 panelek) [303].

Megvizsgáltuk, hogy a kalcium-függő TRESK szabályozás hogyan befolyásolja a csatornafehérje foszforilációs állapotát *in vivo* a plazmamembránban. Ionomycinnel (1  $\mu$ M, 3 min) kezeltünk ugyanannyi petesejtet a kalcineurin inhibitorok nélkül, mint a CsA+FK506 negatív kontroll

csoportban. Ebben a mintában egy kifejezett, intenzív alsó csík jelent meg a Phos-tag kísérletben (mindhárom reprezentatív kísérletben egyértelműen, 63. ábra A1-A3, *ionomycin*, 3-as sávok). A TRESK fehérje számottevő része tehát a defoszforilációnak megfelelő pozícióba vándorolt az *in vivo* calcineurin aktiválás hatására, ezért az alsó csík jóval intenzívebbé vált, mint a CsA+FK506 negatív kontroll csoportban (ld. az alsó csíkot a 2-es és 3-as sávokban a 63. ábra A1-A3 paneleken). Ezzel a kísérlettel először mutattuk ki közvetlen módon, hogy a citoplazma  $[Ca^{2+}]$  növekedés hatására a TRESK csatornafehérje tényleg defoszforilálódik a plazmamembránban.

A TRESK foszforiláltsági állapotának változását PMA hatására szintén a fenti alapelveknek megfelelően vizsgáltuk. PMA-val (100 nM) inkubáltunk, CsA (1  $\mu$ M) és FK506 (1  $\mu$ M) jelenlétében, ugyanannyi petesejtet 45 percig, mint a CsA+FK506 kontroll csoportban. A PMA nem változtatta a TRESK összfehérje mennyiséget a plazmamembrán frakcióban (ld. a 2-es és 4-es sávokat a 63. ábra B1-B3 paneleken). A második reprezentatív kísérletben rövid expozíciót követően láthatjuk, hogy a TRESK összfehérje mennyiség pontosan megegyezik a két mintában (63.B2b ábra, 2-es és 4-es sávok). Ha ugyanezeket a mintákat Phos-tag gélen analizáltuk, akkor az alsó csík minden kísérletben intenzívebb volt a PMA-val kezelt, mint a kontroll csoportban (ld. a 2-es és 4-es sávokat a 63. ábra A1-A3 paneleken). Összesen ötször hajtottuk végre ezt az összehasonlítást független petesejt preparátumok felhasználásával és az alsó csíkok intenzitását denzitometriával elemeztük. Az alsó csík normalizált denzitás értéke növekedett PMA hatására mind az öt független kísérletben (CsA+FK506 vs. CsA+FK506+PMA, az adatokat nem mutatom,  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U teszt), tehát a TRESK fehérje defoszforilálódott a sejtekben a PMA kezelés hatására [303].

A PMA-val kezelt sejtekből származó mintákban, a foszforilált TRESK tartományában megjelenő többlet csík(ok) a csatorna közvetlen, PKC általi foszforilációjának felelhetnek meg (63.A1-A3 panelek, 4-es sávok, *felső* (\*\*) csík). A PKC foszforilációs konszenzus helyek nem esnek egybe a csatorna szabályozó régióival, ezért ezek foszforilációja valószínűleg nem befolyásolja

érdemileg a csatorna aktivitást, illetve az ezt meghatározó szabályozó szerin defoszforilációt [303].

Az eredményeket összefoglalva elmondható tehát, hogy a humán TRESK csatornát az új (novel) típusú PKC $\eta$  és PKC $\varepsilon$  izoformák aktiválják. A PKC-függő aktiváció nem a kalcineurinon keresztül jön létre, hanem a PKC gátolja a szerin klasztert defoszforiláló kinázt. Ennek a kináz aktivitásnak a hiányában a csatorna lassan felszabadul a gátlás alól, ahogy defoszforilálódik a kalcineurintól eltérő, kis mértékű, nem-specifikus foszfatáz aktivitás hatására. Az új típusú PKC tehát közvetett módon, a TRESK szerin klaszter régiójának defoszforilációján keresztül fejti ki a hatását [303].

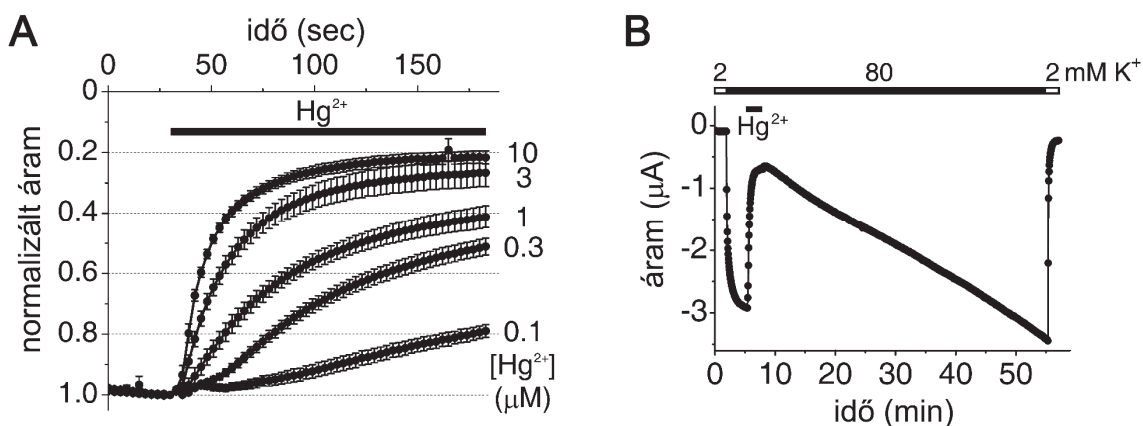
#### 5.14 A Hg<sup>2+</sup> gátolja a TRESK csatornát

A laboratóriumban fellelhető 240 vegyszer hatását megvizsgáltam a TRESK csatornára, abban a reményben, hogy a K<sub>2P</sub> csatornák között TRESK-re specifikus gátlószert sikerül azonosítani. A vegyszereket 10-es csoportokban 5-10  $\mu$ M-os koncentrációban oldottam fel és az így adódó 24 keverék hatását teszteltem az egér TRESK áramon, -100 mV-on, 80 mM EC [K<sup>+</sup>]-ban, *Xenopus* petesejtekben két-elektrodos feszültségzár módszerrel. A három legnagyobb K<sup>+</sup> áram gátlást okozó keverék komponenseit ezután egyesével vizsgáltam. A 30 anyag közül a mibefradil, Zn<sup>2+</sup> és Hg<sup>2+</sup> gátolt legnagyobb mértékben [306].

A mibefradil (3  $\mu$ M) hatása nem volt specifikus a TRESK-re az egér K<sub>2P</sub> csatornák között, a TRESK-hez hasonló mértékben gátolta a TASK-1 csatornát, és kisebb mértékben számos egyéb (TASK-2, TREK-1, TREK-2, TRAAK) csatorna típust is. (A laboratóriumban még nem fellelhető 7 egér K<sub>2P</sub> csatorna típus cDNS-ét RT-PCR módszerekkel megklónoztam különböző egér szövetekből ehhez a vizsgálatssorozathoz.) A Zn<sup>2+</sup> pedig fajspecifikus hatást mutatott, 60 %-kal gátolta az egér TRESK áramot 10  $\mu$ M-os koncentrációban, de egyáltalán nem hatott a humán csatornára (*az adatokat nem mutatom*) [306].

A Hg<sup>2+</sup> erőteljesen gátolta a TRESK áramot (64. ábra). A gátlás IC<sub>50</sub> értékét nem határoztam meg pontosan, mert a higany ion alacsony (pl. 0.1  $\mu$ M) koncentrációban lassan kumulálódó hatást hozott létre és ezért a telítődés nem következett be a mérés időtartamában. Mindenesetre az IC<sub>50</sub> érték biztosan

1  $\mu\text{M}$  alatti, mert ez a koncentráció a mérés végére mintegy 60 %-os gátlást okozott (64. ábra). A  $\text{Hg}^{2+}$   $\text{IC}_{50}$  értéke tehát alacsonyabb, mint a mibefradil (2.2  $\mu\text{M}$ ) és  $\text{Zn}^{2+}$  (5.3  $\mu\text{M}$ )  $\text{IC}_{50}$  értékei (a mibefradil és  $\text{Zn}^{2+}$  dózis-hatás görbéket nem mutatom) [306].



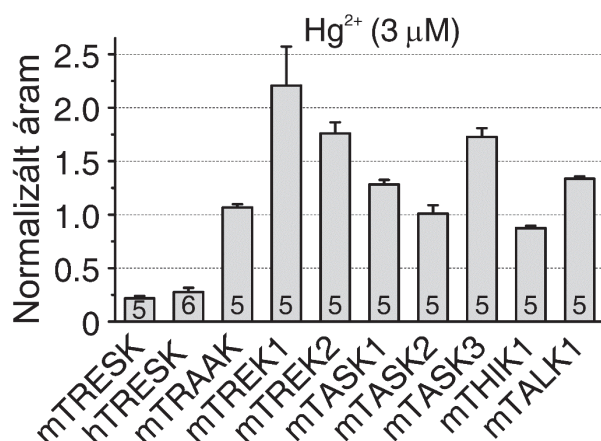
**64. ábra: A  $\text{Hg}^{2+}$  koncentráció-függő TRESK áram gátlást okoz**

**A.** A *Xenopus* petesejtben kifejezett egér TRESK áramot a  $\text{Hg}^{2+}$  különböző koncentrációkban (ld. *jobb oldalon*) eltérő kinetikával gátolja. Minden görbe öt petesejt kiindulási értékre normalizált  $\text{K}^+$  áramának átlagát mutatja. **B.** Az egér TRESK áram lassú visszatérését a gátlásból hosszú ideig mértem, rövid időtartamú  $\text{Hg}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ) kezelést követően. Reprezentatív regisztrátum egy sejtől. Módosítva a [306] közleményből.

A  $\text{Hg}^{2+}$  hatása a TRESK áramra reverzibilis, azonban hosszú idő szükséges a megszűnéséhez (64.B ábra). Ismert, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  a fehérjékben található ciszteinek SH csoportjával erős kötést képez, és a cisztein módosulásnak gyakran funkcionális következménye van. Emiatt a  $\text{Hg}^{2+}$  hatása egészen biztosan nem specifikus a TRESK csatornára, de azért kíváncsi voltam, vajon a  $\text{K}_{2\text{P}}$  családon belül általában létrejön a gátlás, vagy legalább a fehérjék ezen szűk körében TRESK-re specifikus a mechanizmus. Ezért megmértem az összes rendelkezésemre álló (funkcionálisan kifejezhető) egér  $\text{K}_{2\text{P}}$  csatorna  $\text{K}^+$  áram változását 3  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  adása közben. Emellett vizsgáltam a  $\text{Hg}^{2+}$  hatását a humán TRESK csatornára is (65. ábra) [306].

A  $\text{Hg}^{2+}$  egyaránt gátolta a humán és egér TRESK csatornákat ( $72 \pm 4 \%$ , illetve  $78 \pm 2 \%$  gátlás 3  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  hatására,  $p < 0.03$  a humán vagy egér TRESK csatornát bármely más vizsgált egér  $\text{K}_{2\text{P}}$  csatornához hasonlítva, Tukey HSD teszt, 65. ábra). Kis mértékben a THIK-1 csatornát is gátolta a  $\text{Hg}^{2+}$ , azonban

ez ( $13 \pm 2$  % gátlás) messze elmaradt a TRESK-re kifejtett hatástól. A többi  $K_{2P}$  csatornát a  $Hg^{2+}$  nem gátolta, egyes típusok (TASK-3, TREK-1 és TREK-2) több mint 50%-kal aktiválódtak az ion hatására. Ennek megfelelően a  $Hg^{2+}$  nem használható a TRESK *in vivo* specifikus gátlására, azonban jól kontrollált kísérleti körülmények között (pl. heterolog rendszerben) alkalmas a TRESK áram csökkentésére.



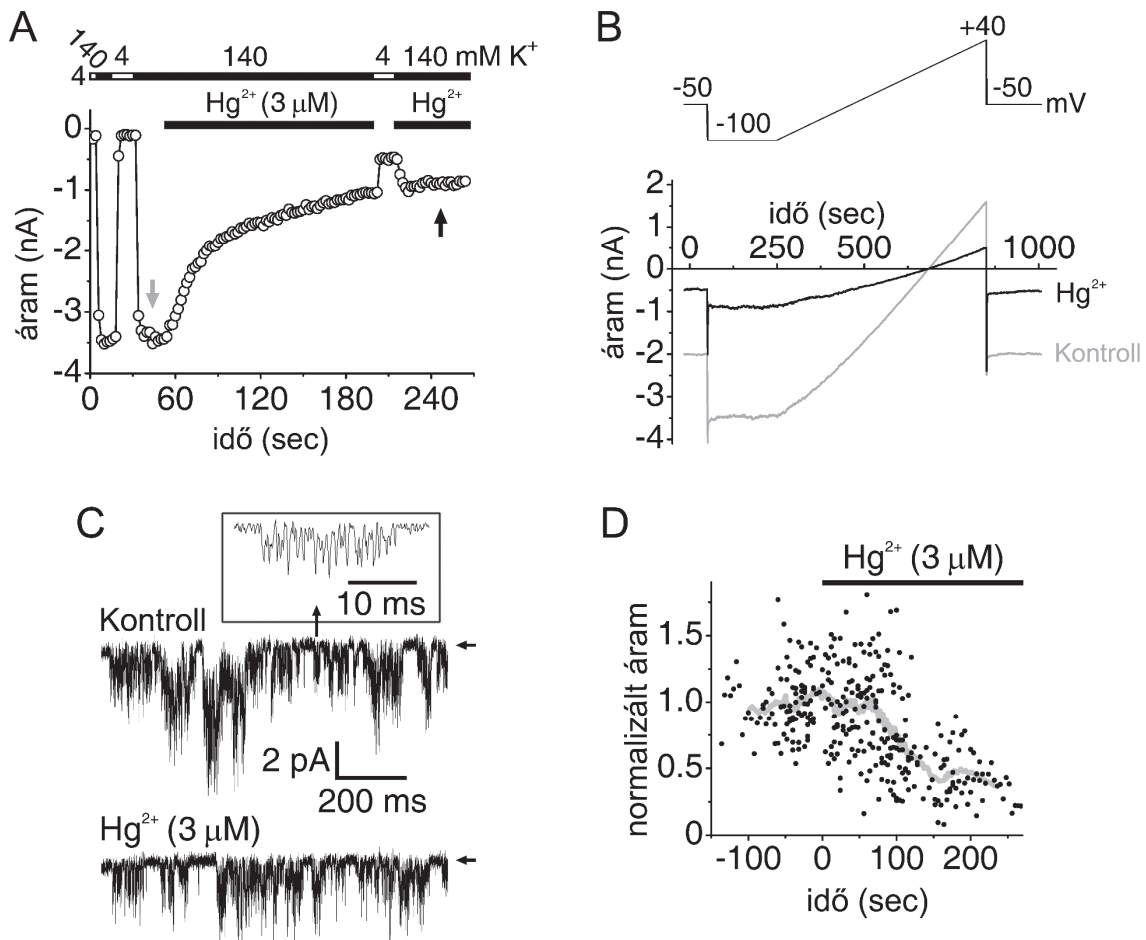
**65. ábra: A  $Hg^{2+}$  hatása a  $K_{2P}$  csatornákra**

Az egér (*m* betű a csatorna név előtt)  $K_{2P}$  csatornákat és a humán TRESK-et (*hTRESK*) *Xenopus* petesejtekben kifejeztük és a  $K^+$  áram változását mértük  $3 \mu M$   $Hg^{2+}$  adásakor. A  $80$  mM EC  $[K^+]$ -ban,  $-100$  mV-on mért kiindulási áramra normalizált értékek átlagát ( $\pm$ S.E.) adtuk meg. Az vizsgált petesejtek számát az oszlopokban tüntettük fel. Módosítva a [306] közleményből.

A  $Hg^{2+}$  TRESK csatornára kifejtett gátló hatását kimutattam a COS-7 (majom vese) sejt vonal expressziós rendszerben is (66.A ábra). A  $Hg^{2+}$  ( $3 \mu M$ ) átlagosan  $88 \pm 1$  %-os TRESK áram gátlást okozott  $140$  mM  $[K^+]$ -ban  $-100$  mV-on ( $n=5$ ), ami jól megfelel a *Xenopus* petesejtekben kapott eredményeknek. A COS-7 teljes sejt patch clamp mérésben a TRESK áramot feszültségrámpák segítségével határoztam meg. A  $140$  mM  $K^+$  koncentrációjú EC és IC oldatokban a TRESK közel lineáris feszültség-áram összefüggést adott, vagyis nem mutatott jelentős rektifikációt. A  $Hg^{2+}$  általi gátlás mértéke jól megegyezett a de- és hiperpolarizált membránpotenciál értékeken, ami arra utal, hogy a  $Hg^{2+}$  nem feszültség-függő módon okoz gátlást (66.B ábra) [306].

Tekintve a  $Hg^{2+}$  általános hatását a fehérjék ciszteineiben található szulfhidril csoportokra, felmerül a kérdés, hogy az ion a csatornára közvetlenül hat, vagy közvetett úton valamilyen más fehérje módosításán keresztül. A kérdés vizsgálatára *Xenopus* petesejt kivágott (excised), külsejét kifelé fordított (outside-out) membrán foltban mértem a TRESK egyedi csatorna (single channel) aktivitás változását  $Hg^{2+}$  ( $3 \mu M$ ) adása közben. A  $Hg^{2+}$  ilyen

körülmények között is gátolta a TRESK áramot, ami valószínűsíti, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  közvetlenül a csatornára fejt ki a hatását (66.C és D ábra) [306].



**66. ábra: A  $\text{Hg}^{2+}$  feszültségtől független módon gátolja a TRESK áramot COS-7 sejtekben és *Xenopus* petesejt kivágott membrán foltban is hat**

**A.** Az egér TRESK áramot két másodpercenként alkalmazott -100 mV-os feszültséglépések végén mértem COS-7 sejtekben teljes sejt patch clamp módszerrel (a B panel felső részén látható feszültségprotokollnak megfelelően), 4 vagy 140 mM EC [K<sup>+</sup>] jelenlétében, ahogy azt a panel feletti *fehér és fekete sávok* mutatják. A  $\text{Hg}^{2+}$  (3 μM) gátolta az áramot. **B.** Az A paneleken *függőleges nyilakkal* jelölt időpontokban mért kontroll (szürke) és gátolt (fekete) áramok feszültség-áram összefüggését megítélhetjük a feszültséggrámpa során nyert adatokból. A  $\text{Hg}^{2+}$  általi gátlás nem mutat jelentős feszültség-függést. Az A és B panelek egy sejtől származó reprezentatív adatokat mutatnak. **C.** *Xenopus* petesejtből kivágott, külsejét kifelé fordított (outside-out) membrán foltban mértem az egér TRESK csatorna egyedi csatorna (single channel) aktivitását, -90 mV-on, szimmetrikus 140 mM-os EC és IC K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatban. A felső (*Kontroll*) regisztrátumon a membránfoltban található csatornák reprezentatív alapaktivitása látható, az alsó görbén ("*Hg<sup>2+</sup> (3 μM)*") a  $\text{Hg}^{2+}$  jelenlétében kialakult aktivitás. A nulla áramsínteket *vízszintes nyilak* jelölik. A két reprezentatív regisztrátumon megfigyelhetjük például, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  jelenlétében a görbe és nulla vonal közötti terület csökken és a nulla áram szegmensek összidőtartama megnő. A két regisztrátum közötti lépték mindkét görbére érvényes. A *kontroll* görbén *függőleges nyillal* jelölt eseménysorozatokat a téglalappal körbekerített területen nagyobb időbeli

felbontással mutatom (ld. a téglalapon belüli vízszintes léptéket. A függőleges lépték megegyezik a téglalapon kívülével.). **D.** Minden egyes adatpont megfelel egy olyan 950 ms-os (4 s-onként felvett) regisztrátum átlag áramának, mint amilyenek a C panelen láthatók. Az összes adatpontot normalizáltam az inhibitor ráadás (0 s) előtti pontok átlagára ugyanabban a membrán foltban. A *középső szürke vastag görbe* a 21 szomszédos adatpontból képzett mozgóátlagok átlagát mutatja a négy kiértékelt membránfoltból. A 0 s körüli adatpontokat elhagytam az oldatcseréből adódó artefaktum kiküszöbölésére. A  $\text{Hg}^{2+}$  gátolta a TRESK áramot ( $p < 10^{-6}$ , a 150 s utáni pontokat hasonlítva a 0 s előttiéhez, Mann-Whitney U test). Módosítva a [306] közleményből.

---

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1 A TRESK háttér $K^+$ csatorna általános jellemzői

A TRESK (TWIK-Related Spinal Cord  $K^+$  Channel;  $K_{2P}$ 18.1; KCNK18 gén) az alegységenként két pórusdomént tartalmazó  $K^+$  csatornák ( $K_{2P}$ ) családjába tartozik [1,2]. Önmagában különálló  $K_{2P}$  alcsaládot képez, mivel alacsony aminosav szekvencia azonosságot (< 20 %) mutat a család többi tagjával (6. ábra) és funkcionális sajátosságai is lényegesen eltérnek az egyéb háttér  $K^+$  csatornáktól. A TRESK alegység, szekvencia hasonlóság és a jellemző szerkezeti vonásai alapján, egyértelműen azonosítható halakban [28,307], tehát valószínűleg már a gerincesek evolúciójának hajnalán elkülönült a többi  $K_{2P}$  csatornától. Az eddig vizsgált fajokban génduplikáció nem jött létre, vagyis nem létezik TRESK-2 csatorna, szemben az egyik korai közlemény állításával [3]. Az egér és humán TRESK ortológok szekvencia azonossága csak 67 %, az egyéb  $K_{2P}$  csatornáknál szokásos 80-90 %-hoz képest [2]. A nagyfokú szekvencia különbség megnyilvánul a farmakológiai érzékenység és a csatorna aktivitás szabályozásának eltéréseiben is. Emiatt emberre vonatkozó következtetéseket csak körültekintően vonhatunk le az egérben kapott eredményekből [302,306-308].

A humán TRESK gén (KCNK18) a 10-es kromoszómán található (a 10q25.3 lokalizációban). A humán TRESK csatorna 384, az egér ortológ pedig 394 aminosavból áll. A TRESK alegység alapvető felépítése megfelel a  $K_{2P}$  csatornákra jellemző 4TMS/2P topológiának, ezen túlmenően azonban egyedi szerkezeti arányokkal rendelkezik. A TRESK C-terminális régiója jóval rövidebb (kb. 30 aminosav), mint a többi  $K_{2P}$  csatorna típusé (ahol a C-terminális átlagosan kb. 120 aminosav hosszú). A TREK és TASK csatornáknál a szabályozó mechanizmusok főként a C-terminálison konvergálnak (ld. a 9. és 10. ábrákat), részben olyan területen, amely a TRESK csatornából hiányzik. Ez a szerkezeti sajátosság, a rövid C-terminális, tehát valószínűsíti, hogy a TRESK csatorna egyedi szabályozási mechanizmusokkal rendelkezik a  $K_{2P}$  családon belül. Ellentétben a rövid C-terminálissal, a második és harmadik transzmembrán hélix között elhelyezkedő intracelluláris hurok régió sokkal

hosszabb (kb. 130 aminosav), mint a néhány (< 30) aminosavból felépülő megfelelő szakasz a többi  $K_{2P}$  csatornában. A ma ismert, TRESK csatornát szabályozó mechanizmusok mindegyike ezen a hosszú intracelluláris hurok régió keresztül hat.

A TRESK csatorna nagy mennyiségben kifejeződik a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok primer szenzoros neuronjaiban [14,17,256]. A trigeminális ganglionban a TRESK mRNS kifejeződésének mértéke kb. háromszorosan meghaladja a hátsó gyöki ganglionban jellemző expressziót [13]. Emellett megtalálható a TRESK csatorna még az autonóm idegrendszer bizonyos neuronjaiban, mint pl. a nervus vagus ganglion nodosumában vagy a szimpatikus idegrendszerhez tartozó ganglion cervicale superiusban [309]. TRESK csatorna kifejeződést közöltek még ezeken kívül egyéb lokalizációkban is, mint pl. a retina bizonyos ganglion sejtjeiben [310], azonban ezek az adatok további független megerősítésre várnak.

A TRESK csatorna tehát igen specifikusan a primer szenzoros neuronokban expresszálódik, szemben az egyéb (pl. TASK vagy TREK)  $K_{2P}$  csatornákkal, amelyek kiterjedt szöveti kifejeződési mintázatot mutatnak a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben egyaránt. RNS szekvenálás módszerrel, összehasonlítva az agyi és több perifériás szöveti expressziós szinttel, a humán TRESK csatornát a primer szenzoros neuronok legszelektívebben expresszálódó  $K^+$  csatornájának találták, az összes  $K^+$  csatorna típust figyelembe véve [11]. Ha a  $K^+$  csatornák mellett az összes többi ioncsatorna típust is bevonták az összehasonlításba – mintegy 300 féle ioncsatorna gén expresszálódik mRNS szinten a hátsó gyöki és trigeminális ganglionban – akkor a TRESK a második legszelektívebben kifejeződő ioncsatornának bizonyult (mindkét szövetben), a  $Na_v1.8$  (SCN10A) feszültségfüggő  $Na^+$ -csatorna után. A TRESK csatorna expresszió, messze az átlagot meghaladó módon, a primer szenzoros neuronokra jellemző.

A primer szenzoros neuronok rendkívül heterogén sejtpopulációt képeznek, amelyen belül funkcionális szempontból elkülönülnek a különböző szomato- és visceroszenzoros modalitásoknak megfelelő sejtcsoportok. Ezek a szubpopulációk eltérő expressziós mintázatot mutatnak, amely megnyilvánul az

egyes ioncsatorna típusok specifikus kifejeződésében is. Egyedi sejt RNS szekvenálás módszerrel meghatározták, hogy a TRESK a polimodális nociceptorok NP1 és NP2 csoportjában expresszálódik. Ezek olyan fájdalomérző neuronok, amelyekben a Mas-rokon G-fehérje-kapcsolt receptor D és A3 (Mas-related G-protein-coupled receptor D and A3 (Mrgprd és Mrgpra3)) marker fehérjék kifejeződnek. Emellett a TRESK mRNS szintén jelen van az NF1 alacsony küszöbű mechanoreceptor neuronokban, amelyek kifejezik a neurofilamentum nehéz láncot (Nefh) és a NECAB2 (N-terminal EF-hand calcium binding protein 2) marker fehérjét [12,13].

Szemben az mRNS sejttípus szerinti megoszlásával, a TRESK fehérje szubcelluláris elhelyezkedését nem ismerjük pontosan. Immunhisztokémiai módszerekkel a csatornafehérje kimutatható a pseudounipoláris neuron sejtestben [17,311], azonban nem tudjuk, hogy megtalálható-e a szenzoros neuron centrális vagy perifériás nyúlványában. Egyértelmű, hogy a TRESK szubcelluláris lokalizációja behatárolja a csatorna valószínű élettani funkcióját. A perifériás végződésben a háttér  $K^+$  csatorna fokozott működése csökkentheti az inger hatására létrejövő depolarizációt és az akciós potenciálok kialakulását. A centrális végződésében a nagyobb  $K^+$  áram hiperpolarizációt és csökkent transzmitter leadást eredményezhet. A közelmúltban leírták, hogy a TREK-1 és TRAAK az idegrost Ranvier befűződéseiben halmozottan fordul elő [312], ezáltal bebizonyosodott az a korábbi hipotézis, mely szerint a  $K_{2P}$  csatornák szerepet játszanak az akciós potenciál időtartam és lefutás szabályozásában [34]. Emiatt felmerül a lehetősége, hogy a TRESK csatorna hasonló szerepet tölthet be bizonyos szenzoros neuron axonok akciós potenciál vezetésében.

Ha a TRESK fehérje nem jut el a szenzoros neuron nyúlványaiba és kizárólag a szómában vagy a periszomatikus régióban található, egyes elképzelések szerint akkor is befolyásolhatja az akciós potenciál terjedést. A  $K^+$  csatorna aktiváció következtében fellépő konduktancia növekedés és hiperpolarizáció gátolhatja az akciós potenciál áterjedését a perifériás és centrális nyúlvány közötti összekötő területen, vagyis a periszomatikus  $K^+$  konduktancia növekedés szűrő (filter) funkciót tölthet be az áthaladó akciós potenciálok tekintetében [313].

A TRESK csatorna kifejezése heterolog expressziós rendszerben háttér  $K^+$  áramot eredményez, amelynek makroszkópos feszültség-áram összefüggése mérsékelt kifelé egyenirányítást (rektifikációt) mutat (18. ábra). A TASK-1 csatornától eltérően, a TRESK kevésbé érzékeny az extracelluláris pH csökkenésére (19.B ábra), ezért ez a csatorna nagy valószínűséggel nem tölt be fiziológias pH-szenzor funkciót. Irodalmi adatok szerint az intracelluláris pH csökkenésre valamivel nagyobb válasz adódik (pH 7.5-ről 5.6-ra savanyítás kb. 60%-ban gátol) [1]. A TREK alcsalád tagjaitól eltérően, a TRESK áramot a hőmérséklet változása a 22-43 °C tartományban nem befolyásolja lényegesen (20%-nál kisebb hatás). Ennek megfelelően, a csatorna valószínűleg nem szerepel a hőmérséklet érzékelésben, mint szenzor fehérje, sőt a kifejezett érzéketlensége a környezeti hőmérsékletre funkcionális szempontból lényeges lehet. A alacsonyabb hőmérsékletű területeken, pl. a bőrben található szenzoros idegvégződéseknél a TREK alcsalád tagjainak aktivitása jelentősen kisebb lehet, mint a maghőmérsékleten, ezzel szemben a TRESK aktivitás alig változik a megfelelő hőmérsékleti tartományban [1].

További különbség a TREK csatornához képest, hogy a telítetlen zsírsavak (pl. arachidonsav) enyhén gátolják a TRESK áramot. Ez valószínűleg inkább farmakológias hatás lehet, mert aránylag magas ( $\approx 10 \mu M$ ) koncentráció szükséges a létrejöttéhez [1]. A TRESK mechanoszenzitivitásáról kevés adat áll rendelkezésre, azonban úgy tűnik, hogy a csatorna nem kifejezetten érzékeny a mechanikai hatásokra. A nyomásváltozás a mérő mikropilláris belső terében nem okoz szembetűnő áram amplitúdó ingadozást patch clamp mérés során, eltérően a TREK alcsalád tagjainál tapasztalhatótól. Az egyik munkacsoport leírta a TRESK enyhe mechanoszenzitivitását, azonban az eredmény független megerősítésre vár [314]. Összefoglalva, a  $K_{2P}$  csatornák egyéb típusait szabályozó fizikokémiai tényezők többségére a TRESK csatorna általában véve nem vagy kevésbé érzékeny.

A TRESK néhány alapvető egyedi csatorna (single channel) tulajdonságát munkacsoportunk közölte elsőként (23. ábra) [2]. A TRESK vezetőképessége 140 mM szimmetrikus  $[K^+]$  esetén, +60 vagy +90 mV-on körülbelül 12-14 pS [2,14]. Pozitív membránpotenciál értékeken a TRESK

négyszögjelszerű megnyílásokat mutat, amelyeknél a nyitott csatorna zaj alig haladja meg a nulla áramhoz tartozót (23.B ábra). Negatív feszültségen viszont a csatorna rövid (akár  $< 1$  ms) megnyílások sorozatait hozza létre, amelyek megfelelhetnek váltakozó átmeneti gátlásnak a nyitott állapot közben (open channel block) vagy fellángolásokban (burst) jelentkező rendkívül gyors kapuzásnak. A jellemző egyedi csatorna vezetőképesség mellett, ez az aszimmetrikus kapuzási viselkedés (negatív vs. pozitív feszültségeken) elősegíti a TRESK csatorna felismerését, illetve a regisztrátum alapján a membrán foltban a csatorna orientációja is megítélhető. A TRESK egyedi áram megkülönböztető jegyeit sikeresen alkalmazták a csatorna azonosítására hátsó gyöki ganglion neuron membrán foltokban [14].

A TRESK a  $K_{2P}$  családra jellemző általános farmakológiai tulajdonságokkal rendelkezik. Az extracelluláris tetraetil-ammónium (TEA, 3 mM) feszültségfüggő gátlást okoz, csak negatív membránpotenciál értékeken gátol aránylag enyhén ( $-100$  mV-on kb. 40 %-ban, I. táblázat és 19.A ábra). A 4-aminopiridin (4-AP, 3 mM) kis mértékű (kb. 30 %-os) gátlást okoz feszültségtől független módon. A  $K^+$  szelektív pórust blokkoló  $Ba^{2+}$  (300  $\mu$ M) és  $Cs^+$  (3 mM) egyaránt feszültségfüggő gátlást okoznak, főként negatív membránpotenciál értékeken gátolják az áramot. Az inhalációs anesztetikum halothán még a  $K_{2P}$  csatornák között is szokatlanul potens módon aktiválja a TRESK-et [114,308], 1 mM koncentrációban a *Xenopus* expressziós rendszerben mintegy kétszeresére növeli a  $K^+$  áramot néhány perc alatt (I. táblázat és 19.C ábra).

Alacsony koncentrációban ható és specifikus TRESK aktiváló- vagy gátlószert mind a mai napig nem ismerünk, azonban számos próbálkozás történt a csatorna farmakológiai sajátosságainak felderítésére. Aránylag kiterjedten alkalmazták az antiepileptikum lamotrigint a TRESK gátlására heterolog rendszerben és natív sejtekben [311,315-317], habár ez a hatóanyag ismert módon számos egyéb ioncsatornát is befolyásol és szelektivitása a  $K_{2P}$  családban kevésbé ismert. Összefüggésbe hozták emellett a TRESK csatornát a szechuáni bors aktív hatóanyagával, a hidroxil- $\alpha$ -sanshoollal, amely a TRESK csatorna mellett egyértelműen gátolja a TASK-1 és TASK-3 csatornákat is [318-

320]. A háttér  $K^+$  áramok gátlása az érzőneuronokban (egyéb hatásmechanizmusok mellett) hozzájárulhat a sajátosan bizsergető enyhén pikáns íz kialakításához, amely egyértelműen különbözik a csípős paprika (kapszaicin) által okozott "égető" érzéstől. Az isobutylalkenyl amide (IBA) sanshool-analógot felhasználták, mint aránylag TRESK-szelektív gátlószert *in vitro* kísérletekben és élő állaton végzett viselkedési tesztekben [321]. Ugyanez a munkacsoport később kimutatta, hogy a TRESK csatorna gátlása hozzájárul a pyrethroid típusú rovarirtók toxikus, paresztéziát okozó hatásához is [322].

Eredményeink szerint a  $Hg^{2+}$  alacsony koncentrációban és a  $K_{2P}$  csatornák között specifikusan gátolja a TRESK-et (64-66. ábrák). Tekintetbe véve, hogy ez a hatás nagy valószínűséggel közvetlenül a csatornafehérje kémiai módosításával jön létre, várhatóan kialakul *in vivo* is, mérgezés esetén. Mindazonáltal előreláthatóan a TRESK áram gátlás hatását elfedheti a szenzoros neuronban szintén nagy mennyiségben megtalálható TREK-1 és TREK-2 csatornák áramának növekedése (65. ábra). Összességében kérdéses marad, hogy a TRESK csatorna gátlása hozzájárul-e a  $Hg^{2+}$  mérgezés tüneteinek kialakulásához.

Elsőként írtuk le, hogy bizonyos farmakológiai ágensek állapot-függő hatást fejtenek ki a TRESK csatornára. A helyi érzéstelenítő benzocain például (magas, 1 mM koncentrációban) sokkal jobban gátolja a TRESK áramot a kalcium-függő aktivációt követően, mint azt megelőzően (31. ábra). Ez a jelenség, bizonyos kísérletes körülmények között, jól felhasználható a nyugalmi és kalcium-aktivált TRESK áram elkülönítésére.

Mindazonáltal az állapot-függő TRESK moduláció motívuma más esetekben is megfigyelhető. Wright P.D. és mtsai. vegyszer könyvtár szűrésével és nagy áteresztőképességű tallium-fluxus mérőmódszerrel azonosították a cloxyquin (5-chloroquinolin-8-ol) antiamőbás szert, mint a TRESK csatorna aktivátorát [323]. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a cloxyquin a TRESK szelektív aktivátora a  $K_{2P}$  családon belül ( $EC_{50} \approx 20-40 \mu M$ ) és egyben állapot-függő aktivációt hoz létre [324]. A csatorna árama sokkal nagyobb mértékben aktiválódik bazális körülmények között cloxyquin hatására, mint a kalcium-függő aktivációt követően [324]. Mindemellett a cloxyquin

bizonyos kémiai módosítása TRESK gátló származékot eredményezett (pl. A2764 vagy A2793) [325]. A TRESK gátló cloxyquin származékok fordított módon okoztak állapot-függő gátlást, vagyis erőteljesebben gátolják a kalcium-függő úton aktivált TRESK áramát, mint a nyugalmi állapotú csatornát [325].

A TRESK farmakológiai befolyásolásának lehetőségeit célzó vizsgálatok kezdetleges stádiumban vannak, azonban a kezdeti eredmények azt mutatják, hogy lehetséges az egyes  $K_{2P}$  csatornák, illetve ezen belül a TRESK áramát szelektíven módosítani. Tekintetbe véve a TRESK specifikus kifejeződését a primer szenzoros neuronokban, a csatornát aktiváló ágensek felhasználhatók a neuronok kóros ingerlékenységének csökkentésére, ahogy azt a cloxyquinnel végzett állatkísérletek [260], vagy a TRESK virális overexpressziójával nyert eredmények alátámasztják [317,326,327].

A TRESK a  $K_{2P}$  csatornák között egyedülálló módon szabályozódik a  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptorok ingerlésének hatására. Elsőként írtuk le, hogy a receptor ingerlés többszörösére növeli a TRESK áramot (20. ábra) [2], szemben a többi  $K_{2P}$  csatornával, amelyek azonos körülmények között gátlódnak vagy áramuk nem változik. A TRESK molekuláris szabályozásának vizsgálatánál a fő célunk az volt, hogy a receptor-függő TRESK aktiválódás mechanizmusát minél jobban megismerjük.

## 6.2 A TRESK molekuláris szabályozási mechanizmusai

A  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptor agonisták másként hatnak a TRESK működésére, mint a TREK és TASK családba tartozó csatornák áramára. A receptor ingerlés különböző mechanizmusokkal gátolja a TREK és TASK csatornákat (ld. 9. és 10. ábrákat), ezzel ellentétben viszont a TRESK többszörösére aktiválódik (20. ábra) [2]. Az aktivációt létrehozza a koexpresszált  $AT_{1a}$  angiotenzin és  $M_1$  muszkarinos acetilkolin, illetve a *Xenopus* oocita endogén lizofoszfátidsav (LPA) receptor ingerlése is. A  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptor agonisták a *Xenopus* petesejt expressziós rendszerben a TRESK áram 5-10-szeres növekedését okozzák, overexpresszált vagy endogén receptor expressziós szint esetén egyaránt (20. ábra) [2].

Eredményeink közlését követően, a  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptorok TRESK aktiváló hatását számos munkacsoport megerősítette [14,17,258,307,315].

A *Xenopus* petesejtekben kifejezett TRESK csatorna áramát a különböző  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptorok ingerlése minden vizsgálatban többszörösére növelte. Ettől elmaradt azonban az aktiváció mértéke azokban a teljes sejt (whole cell) patch clamp mérésekben, amelyeket emlős sejtvonal heterolog expressziós rendszerben végeztek (többnyire 30-100 % aktiváció jött létre). Vizsgálni kezdtük, hogy mi lehet a kisebb TRESK aktiváció oka az emlős sejtekben és arra következtetésre jutottunk (az eredményeket nem mutatom), hogy megfelelő körülmények között (alacsony EC  $[Ca^{2+}]$ , ATP mentes pipettaoldat) HEK-293 sejtekben is létrehozható többszörös TRESK áram növekedés  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptor ingerlés hatására [7]. A receptor-függő aktiváció mérése előtt, a patch clamp felállás kialakítása közben, a citoplazma nyugalmi  $Ca^{2+}$  koncentrációt feltétlenül alacsony szinten szükséges tartani. Máségyébként a mérés eleve is aktivált TRESK állapotból indul, a szabályozás nagyfokú kalcium-érzékenysége és lassú reverzibilitása miatt. A TRESK aktiváció könnyebben mérhető a *Xenopus* petesejt expressziós rendszerben, ahol a citoplazma összetétel jó közelítéssel változatlan a két elektródos feszültség clamp mérés során.

Hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion, DRG) neuronokban is kimutatták a  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptor ingerlés hatását a TRESK csatornára. Az endogén muszkarinos acetilkolin, metabotrop glutamát és  $H_1$  hisztamin receptorok ingerlése szignifikáns módon, kb. 30-80 % mértékben aktiválta a TRESK csatornát sejtre tapasztott pipettás (cell-attached) patch clamp mérésekben [315]. Teljes sejt (whole cell) patch clamp mérésben, a DRG neuronok endogén lizofoszfátidsav (LPA) receptorainak ingerlése is megnövelte a TRESK áramot, de a TRESK génhiányos állatból izolált kontroll sejteken  $K^+$  áram növekedés nem jött létre [311]. Az LPA-val kezelt DRG neuronok kisebb frekvenciával képeztek akciós potenciálokat ugyanakkora stimuláló áram hatására áramzár (current clamp) mérésben, mint a kezeletlen vagy TRESK génhiányos sejtek. Tehát a TRESK receptor-függő aktivációja erőteljesen csökkentette a DRG neuronok ingerlékenységét [311].

Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a TRESK aktivációt a citoplazma kalcium koncentráció növekedése váltja ki. Ezt a következtetést több egybehangzó eredmény is támogatja, aktiválódik a TRESK csatorna ionomycin kalcium ionofór hatására és inozitol-1,4,5-triszfoszfát ( $IP_3$ ) vagy kalciummal telített EGTA kelátor mikroinjektálás után is (21. és 22. ábrák). Tehát a citoplazma  $[Ca^{2+}]$  növelése három különböző mechanizmussal egyaránt aktiválta a TRESK csatornát. Ebből következik, hogy a  $[Ca^{2+}]$  növekedés önmagában elegendő a csatorna aktiváció kialakulásához és az aktivációs mechanizmus nem függ a kalcium forrásától, illetve további, a kalcium jel kiváltására specifikus körülményektől. Az EGTA kalcium kelátor mikroinjektálása viszont teljesen kivédte a receptor-függő TRESK aktivációt (22. ábra). Ez arra utal, hogy nem létezik (legalább is a *Xenopus* petesejtben) olyan receptor-függő módon indított jelátviteli mechanizmus, amely aktiválja a TRESK csatornát és  $[Ca^{2+}]$  növekedés hiányában is végbemegy. Ebben az értelemben véve, a  $[Ca^{2+}]$  növekedés a TRESK aktiváció szükséges és elégséges feltétele.

A kalcium ion nem közvetlenül a TRESK csatorna fehérjekomplexen fejti ki a hatását (23. ábra), hanem a kalcium/kalmodulin-dependens protein foszfatáz kalcineurinon keresztül hat. Gyakorlatilag teljesen kivédik a TRESK aktivációt a kalcineurin specifikus gátlószerei, a ciklosporin A és FK506 (25. ábra). A két eltérő támadáspontú gátlószerezrel kapott farmakológiai eredményeken kívül, molekuláris biológiai megközelítés, a konstitutívan aktív kalcineurin koexpresszióval (vagy rekombináns fehérje mikroinjektálással) előidézett TRESK aktiváció (26. ábra) is megerősítette a foszfatáz szerepét a folyamatban. A kalcineurin gátlószerek TRESK aktivációt közel teljes mértékben kivédő hatása emellett azt is megmutatja, hogy nem létezik olyan kalcium-függő folyamat a kalcineurin aktiválódáson kívül, amely a TRESK csatorna áramát önmagában befolyásolja. Továbbá, a konstitutívan aktív kalcineurin koexpresszió (vagy mikroinjektálás) TRESK aktiváló hatása igazolja, hogy a csatorna szabályozást önmagában a kalcineurin létrehozza, ehhez további kalcium-függő járulékos mechanizmus nem nélkülözhetetlen.

A kalcineurin közvetlenül defoszforilálja a TRESK csatornát a szerin klaszter területén, amely a humán csatornában az RLSYISNLD szekvenciát

és benne az S262, 264 és 267 szerineket jelenti, az egér ortológban pedig az RLSCSILSNLD szekvenciát és S274, 276 és 279 aminosavakat. A szerin klaszterben az első két szerin valamelyikének alaninra cserélése megakadályozza a csatorna aktivációt és a középső szerin alaninnal helyettesítése emellett egyértelműen konstitutívan aktív csatornát eredményez (27. ábra). Ha a rekombináns TRESK hurok régiót *in vitro* foszforiláltatjuk konstitutívan aktív MARK2 kinázzal [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP jelenlétében, akkor ezt a radioaktívan jelölt szubsztát fehérjét az egér agy citoszol kalcium-függő módon defoszforilálja (39. ábra). Vagyis a citoszolban található kalcium-függő foszfátáz szubsztátja a szerin klaszter. Mindemellett, a teljes TRESK fehérje *in vivo* defoszforilációja ionomycin kezelés hatására megnyugtató módon kimutatható a *Xenopus* petesejt membránjában a Phos-tag™ SDS-PAGE módszer segítségével (63. ábra).

Az alanin-pásztázó mutagenézis kimutatta, hogy a szerin klaszteren kívül az RSNSCP 14-3-3-kötő motívumban található szerin (humán csatornában S252, egér TRESK-ben S264) mutációja is interferál a csatorna szabályozással (27. ábra). Ennek megfelelően ez a szerin is a kalcineurin szubsztátja lehet. Ha ezt a szerint glutamátra cseréljük (S264E), akkor csökken a kalcium-függő TRESK aktiváció mértéke, ha pedig vele együtt a szerin klaszter központi szerinjét is glutamáttal helyettesítjük (S264E/S276E dupla mutáns egér TRESK), akkor a kalcium-függő szabályozás teljesen megszűnik (28. ábra). Ez azt sugallja, hogy a szabályozásban potenciálisan szereplő négy szerinen kívül a TRESK alegységben található többi szerin és treonin nem játszik meghatározó szerepet a csatorna aktivitás kalcium-függő módosításában.

A kalcineurin közvetlenül kötődik a TRESK csatornához. A csatorna hurok régióban található PxIxIT-szerű kalcineurin-kötő PQIIS motívum (egér TRESK-ben PQIVID) alapvető szerepet játszik a TRESK kalcium-függő szabályozásában. A motívum megszüntetése alanin mutációkkal az egér TRESK csatorna esetében teljesen (ld. 30. ábra, ugyanezt a megfigyelést függetlenül megerősítették mások is [311]), a humán TRESK-nél pedig majdnem teljesen kivédi a kalcium-függő aktivációt (34. ábra). Az eredmények tehát azt mutatják, hogy a kalcineurin kihorgonyzódása a csatornához olyan

fontos szerepet játszik, hogy hiányában a kalcineurin-függő TRESK szabályozás elmarad.

A humán TRESK csatorna PQAAAS mutáció jelenlétében is megmaradó mintegy kétszeres kalcium-függő aktivációért egy második kalcineurin-kötő motívum felelős. Ez az LQLP motívum, amely hozzávetőlegesen megfelel az NFAT kalcineurin-kötő LxVP konszenzus szekvenciájának, a kalcineurin célpont szerinek közvetlen szomszédságában, azoktól néhány (8, 18, 20 és 23) aminosavval az N-terminális irányban található [9]. A szubsztrát szerinek, a PQIIS és LQLP motívumok elrendeződése a TRESK-ben merőben különbözik az NFAT transzkripció faktorban megfigyelhető helyzettől. Az NFAT-ban defoszforilálódó 13 szerin egy kb. 200 aminosav hosszúságú területen oszlik el, amely az N-terminálisan található PxlIT motívum és a C-terminális LxVP között helyezkedik el [328]. A KSR2 fehérje (Kinase Suppressor of Ras 2) az NFAT-hoz hasonló elrendeződésben, mintegy 200 aminosavnyi területen tartalmazza a három kalcineurin-szubsztrát szerinjét a két foszfatáz kötőhely között [329]. A fehérjék egy másik csoportjában viszont a TRESK-hez hasonló elrendeződés érvényesül a szubsztrát szerinek és kalcineurin kötőhelyek tekintetében. Az RCAN1 (Regulator of calcineurin 1) fehérje két szubsztrát szerinje 8 és 12 aminosavval a C-terminális irányban található az LAPP motívumtól, amely az LxVP megfelelője [283]. Hasonlóan a Drp1 (dynamin related protein 1) fehérjében csak hét aminosav található az LxVP hely és a defoszforilált szerin között [330]. Az irodalmi adatok szerint tehát nem kivételes a TRESK-ben megfigyelhető elrendezés és a kalcineurin defoszforilálni tudja az LxVP-szerű kötőhelyhez C-terminális irányban közel elhelyezkedő foszfoszerineket.

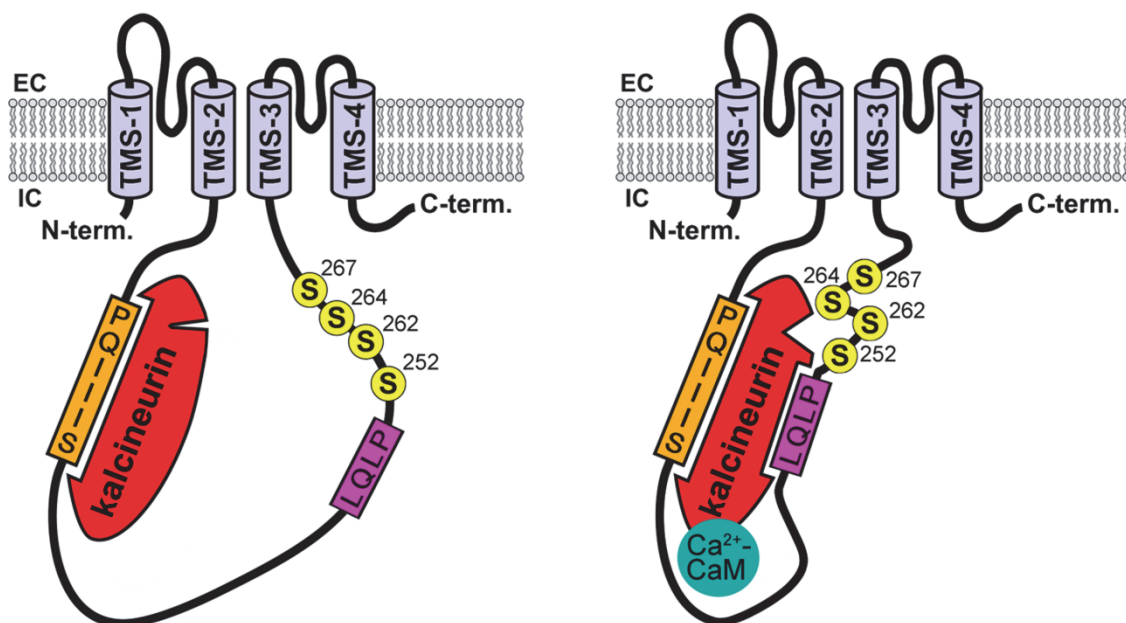
A humán TRESK LQLP motívumában a leucinok alaninra cserélése (AQAP mutáns) nem befolyásolta szignifikáns módon a magas kalcium koncentrációval kiváltott aktiváció végső szintjét, habár kissé lassította a szabályozási folyamatot (36. ábra). Ez lényegesen eltér a PxlIT-szerű hely mutációjának hatásától, hiszen a humán TRESK PQAAAS (34. ábra) és eger csatorna PQAVAD (30. ábra) mutációk drámaian csökkentették az aktiváció végső mértékét. Az AQAP mutáció viszont kifejezetten csökkentette a TRESK aktivációt akkor, ha a csatornát mérsékelt citoplazma  $[Ca^{2+}]$  növeléssel

aktiváltuk (37. ábra). Az AQAP mutáció létrehozta az aktivációs folyamat kalcium-érzékenységének csökkenését a TRESK-PVIVIT mutáns csatornában is, amelyben a PQIIS motívumot ( $K_d \approx 5 \mu\text{M}$ , [285]) a nagyobb kalcineurin iránti affinitású PVIVIT motívummal ( $K_d \approx 0.5 \mu\text{M}$ , [285]) helyettesítettük (40. ábra). Továbbá, a TRESK-PVIVIT háttérben kimutatható volt a fokozott aktiváció mérsékelt  $[\text{Ca}^{2+}]$  növekedés hatására, ha a TRESK natív TLQLPP szekvenciáját az NFAT YLAVPQ motívumára cseréltük (40. ábra). Tehát az LQLP motívum megfelelő mutációival mindkét irányban módosítani tudtuk a mérsékelt  $[\text{Ca}^{2+}]$  növelés hatására létrejövő aktiváció nagyságát abban a csatornában, amelyben a PxlIT helyen a PVIVIT motívummal az általunk ismert lehető legnagyobb kalcineurin iránti affinitást hoztuk létre. Mindezek az eredmények azt sugallják, hogy a TRESK csatornában a két kalcineurin kötőhely szerepe nem ekvivalens, hanem ezek eltérő módon járulnak hozzá a szabályozási folyamathoz.

A 38.B ábrán a kalcineurin jobban kötődött a csak LQLP motívumot tartalmazó csali fehérjéhez kalcium jelenlétében (3. vagy 4. sáv), mint kalcium hiányában (2. sáv). Ez az eredmény megfelel azoknak az irodalmi adatoknak, melyek szerint az LxVP motívumhoz elsősorban a kalcium/kalmodulin-függő aktivációt követően kötődik a kalcineurin, viszont a foszfatáz kötődése a PxlIT motívumhoz független a  $[\text{Ca}^{2+}]$ -tól [273-276,284,331]. Ennek megfelelően a kalcineurin kötődését a TRESK csatornához két egymást követő lépésként képzelhetjük el (67. ábra). A kalcineurin kihorgonyzódik a PQIIS motívumhoz nyugalmi körülmények között is, a citoplazma kalcineurin koncentrációjának függvényében a kötőhelyek egy része telített lehet. A kalcium jel hatására a kalcineurin kapcsolódik az LQLP motívumhoz is és ezáltal megfelelően pozícionálódik a szubsztrát szerinek hatékony defoszforilációjához. (A kalcineurin különböző felületei felelősek a PxlIT és LxVP motívumok kötéséért és létrejöhet a foszfatáz interakciója mindkét motívummal egyidejűleg [331].)

Másként fogalmazva, a PQIIS hely főként a kalcineurin elérhetőségét biztosítja a reakcióhoz, az LQLP szekvencia pedig az aktív foszfatáz hatékony hozzáférését a szubsztrát szerinekhez. Ha PQIIS funkciót felfüggesztjük, akkor alig jön létre a reakció, ha pedig kiiktatjuk az LQLP motívumot, akkor lelassul a

folyamat. Az LQLP motívum hozzájárulása a TRESK aktivációhoz akkor válik különösen kritikussá, amikor a mérsékelt  $[Ca^{2+}]$  növekedés hatására a foszfatáz csak gyengén aktiválódik, vagyis az időnek csak egy kis hányadát tölti az aktív állapotban. Az LQLP motívum valószínűleg fontos szerepet játszik a TRESK aktivitás szabályozásában a fiziológiás, kis mértékű kalcium koncentráció változások során és lehetővé teszi a csatorna aktivitás finom beállítását.



**67. ábra: A calcineurin-függő TRESK aktiváció sematikus vázlata**

A PQLIS motívum (*narancssárga*) nyugalmi állapotban is köti a calcineurint, a kötőhely telítettsége elsősorban a citoplazma calcineurin koncentráció függvénye. Kalcium jel esetén a kalcium/kalmodulin komplex (*türkiz*) a calcineurinhez kötődik és ennek hatására a calcineurin hozzákapcsolódik a TRESK másik, LQLP calcineurin-kötő motívumához is (*lila*). A kalcium/kalmodulin komplex egyben fokozza a calcineurin enzimaktivitását, amely defoszforilálja a TRESK csatorna aktivitást szabályozó szerineket (*citromsárga*). A calcineurint *piros*, a TRESK transzmembrán régiókat pedig *világoskék* színnel ábrázoltuk. A motívumok szekvenciája és a számozás a humán TRESK csatornára vonatkozik. Módosítva a [9] közleményből.

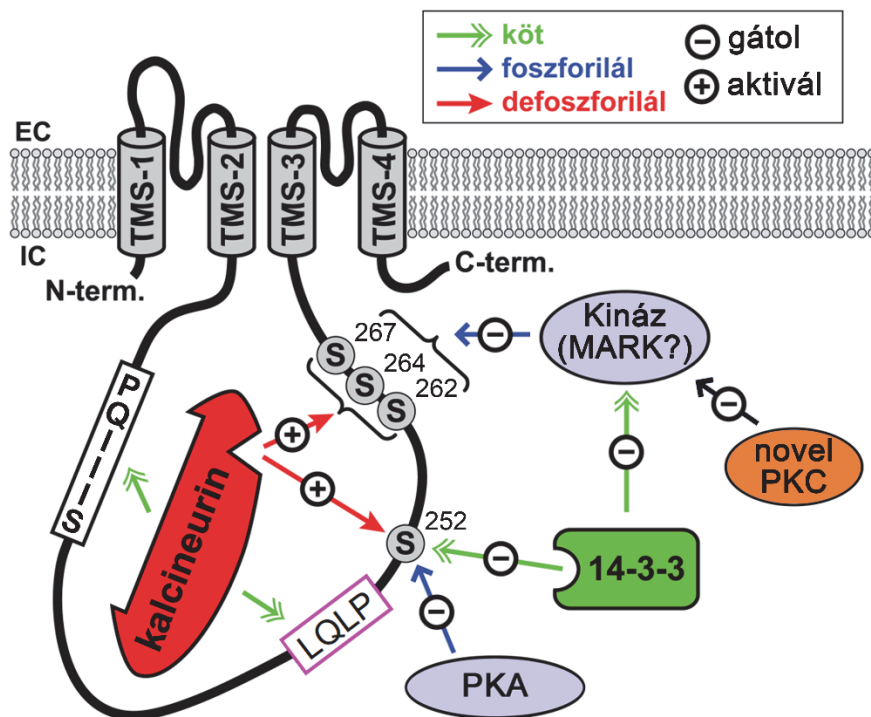
A calcineurin-függő aktivációt követően, gátló kinázok biztosítják a TRESK áram visszatérését a nyugalmi helyzetbe. Szintén ezek tartják fent a TRESK bazális gátolt állapotát. Azokat a csatorna szabályozásban fontos szerineket foszforilálják, amelyek a calcineurinnak is célpontjai. A TRESK aktivitását döntően meghatározó "szerin klasztert" a mikrotubulus(-asszociált-fehérje/mikrotubulus)-affinitás-reguláló kináz (MARK) 1, 2 és 3 foszforilálja heterolog expressziós rendszerben. (A MARK2 kináz megfelel a PAR-1

“partition-defective” fehérjének [301].) A MARK kinázok koexpressziója felgyorsítja a  $K^+$  áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcium-függő aktivációt követően (56. ábra). A MARK kinázok emellett gátolják a TRESK bazális áramát, ezért a kinázt és csatornát koexpresszáló sejtekben a kalcium jel hatására fellépő relatív aktiváció akár harmincszorosra is fokozódhat (54.C ábra). Habár a MARK kinázok hatékonyan foszforilálják és ezáltal gátolják a TRESK csatornát heterolog expressziós rendszerben, nem tudjuk, hogy vajon ezek a kinázok felelősek-e döntően a szerin klaszter foszforilációjáért élettani körülmények között. Mindazonáltal számos, más ioncsatornát szabályozó kináz típusról (ld. II. táblázat) kimutattuk, hogy nem képesek a TRESK szerin klasztert foszforilálni.

A TRESK szabályozásában szintén fontos S252 (egérben S264) aminosavat *in vitro* foszforilálja a protein kináz A (53. ábra). A citoplazma cAMP koncentráció kísérletes növelése elősegítette a szerin klaszter területén mutáns TRESK csatorna áramának visszatérését a gátolt állapotba, az ionomycinnel kiváltott aktivációt követően (51. és 53. ábrák). Emiatt az S252 valószínűleg hozzájárul a TRESK aktivitás szabályozásához, mindemellett ugyanez a szerin más tekintetben is szembeötlő szerepet játszik a TRESK működésében. Az S252 foszforilációja szabályozza a 14-3-3 adapter fehérje kötődését a TRESK csatorna RSNSCP motívumához (41. és 47. ábrák).

A dimer szerkezetű 14-3-3 adapter fehérje ubikviter az eukarióta sejtek citoplazmájában és több mint száz különböző partner fehérje (vagy fehérjepár) működését befolyásolja [289-293]. Foszforiláció-függő kötődése módosíthatja a célfehérjék aktivitását, lokalizációját és fehérje interakcióit. Míg a TRESK kalcineurin-kötő motívuma megtalálható az emlős fajokban és hiányzik pl. a halakban vagy madarakban, addig a csatorna RSNSCP 14-3-3-kötő motívuma a halaktól az emberig konzervált (43. ábra). Az S276E mutáns egér TRESK és vad típusú vagy domináns negatív 14-3-3 $\gamma$  koexpressziójával végzett kísérletek (50.C és D ábra) közvetett módon arra utalnak (ld. az 5.11 fejezetet), hogy az RSNSCP motívum foszforilációja és 14-3-3 kötése hozzájárul a TRESK csatorna gátlásához.

A 14-3-3 közvetlen, csatornára kifejtett hatása mellett azonban az adapter fehérje erőteljesen befolyásolja a TRESK szabályozását egy másik útvonalon keresztül is (68. ábra).



**68. ábra: A TRESK csatorna foszforiláció-függő szabályozási útjainak sémája**

A humán TRESK csatorna aktivitását az S262, S264, S267 "szerin klaszter" foszforilációs állapota határozza meg, illetve hozzájárulhat ehhez még az S252 foszforiláció-függő 14-3-3-kötőhely kiegészítő hatása. A kalcineurin közvetlenül kötődik a csatorna PQIIIS motívumához, emellett az LQLP motívumhoz is kihorgonyozódik a citoplazma  $[Ca^{2+}]$  növekedés hatására. Az aktivált kalcineurin defoszforilálja a szabályozó szerineket és ezáltal növeli a TRESK csatorna áramát. A csatornát kinázok gátolják, a szerin klasztert a MARK (és esetleg más még nem azonosított) kinázok foszforilálják, az S252 pedig a protein kináz A (PKA) szubsztrátja. A foszforilált S252 aminosavhoz kötődik a 14-3-3 adapter fehérje és ez hozzájárulhat a csatorna gátlásához. A 14-3-3 egy másik TRESK szabályozó útvonalban is szerepet játszik, kifejezett hatása, hogy gátolja a szerin klasztert foszforiláló kinázt. Az új (novel) típusú protein kináz C (PKC) is gátolja ezt a kinázt és a TRESK foszforilációjának csökkentésével eredményez fokozott csatorna aktivitást. (A kalcineurint aktiváló kalcium/kalmodulin komplexet és a TRESK, kalcineurin, PKA és 14-3-3 fehérjék negyedleges szerkezetét nem ábrázoltuk.) Az ábrán feltüntetett összes szabályozó mechanizmust elsőként írtuk le az irodalomban. Módosítva a [6] közleményből.

A 14-3-3 funkció csökkentésének (domináns negatív 14-3-3 koexpresszióval vagy fehérje mikroinjektálással, illetve pS-Raf259 gátló peptid mikroinjektálással) konzekvens következménye volt a kalcium-függő aktiváció utáni TRESK áram visszaállás gyorsulása (44-46., 48.B ábrák). Ez a hatás

létrejött a humán és egér TRESK csatorna esetében is, függetlenül attól, hogy milyen módszerrel csökkentettük a működőképes 14-3-3 szintet. Megfigyeltük az S264E mutáns csatorna szabályozása kapcsán is (50.B ábra), annak ellenére, hogy az S264E mutáns csatorna 14-3-3-kötőhelyének foszforilációját a mutáció lehetetlenné tette. Az S264E mutáns szabályozása a szerin klaszter foszforilációs állapotának változásán keresztül történik, tehát a visszaállás gyorsulása azt jelenti, hogy a 14-3-3 a szerin klasztert foszforiláló kináz gátolja, a TRESK csatornához kötődéstől független mechanizmussal. Mikor a 14-3-3 működést akadályozzuk, akkor a szerin klasztert foszforiláló kináz felszabadul a gátlás alól, gyorsabban foszforilálja a kalcineurin által defoszforilált szabályozó szerineket a TRESK csatornában és ez nyilvánul a visszaállás gyorsulásában.

A 14-3-3 szabályozásban betöltött szerepével kapcsolatban első ránézésre ellentmondásosnak tűnhet, hogy az egyik útvonalon kötődésével gátolja a csatornát, a másik útvonalon viszont akadályozza a szerin klasztert foszforiláló kináz, tehát végeredményben TRESK aktiváló irányban hat (68. ábra). Ez azonban csak látszólagos ellentmondás. Igaz ugyan, hogy a kísérletekben a 14-3-3 szerepét a működőképes 14-3-3 szint változtatásával vizsgáltuk, de *in vivo* ez nem a szokásos módja a 14-3-3-függő szabályozásoknak. A 14-3-3 által közvetített hatást *in vivo* elsősorban az határozza meg, hogy a szabályozott fehérje 14-3-3-kötő motívumában foszforilált-e a kötődést biztosító szerin. A TRESK esetében a közvetlen 14-3-3-kötést az S252 foszforilációja dönti el és a szerin klasztert foszforiláló kináz szabályozásában is minden bizonnyal szerepel valamelyik ponton egy foszforiláció-függő 14-3-3-kötőhely, amelyet egy másik kináz foszforilál (erre lehetséges jelölt a novel PKC). Ezeket a foszforilációkat eltérő jelpályák befolyásolhatják, amelyek hatására specifikusan szabályozódik a TRESK csatorna a megfelelő irányban, a mindig jelenlévő 14-3-3 kötődésének közreműködésével.

Az alacsonyabb rendű állatokban (pl. halak, kételtűek, hüllők és madarak) a TRESK 14-3-3-kötését tudomásunk szerint még nem vizsgálták, a nagy mértékű szekvencia hasonlóság miatt azonban gyakorlatilag biztos, hogy

ezek is kötik az adapter fehérjét. Ezekben a fajokban viszont a kalcineurin-kötő motívumok és a szerin klaszter nem található meg, ami arra utal, hogy a 14-3-3-nak a kalcium-függő szabályozástól eltérő fontos funkciója is van. Ez a funkció egyelőre ismeretlen, a 14-3-3 talán a csatorna alegység dimerek szerkezetét stabilizálja vagy interakciós partner fehérje kihorgonyzásában szerepelhet.

Az új (novel) típusú PKC a kalcineurintól független módon szabályozza a humán TRESK csatornát abban az értelemben véve, hogy a kalcium/kalmodulin-dependens foszfatáz nem vesz részt a PKC hatásának közvetítésében. Más tekintetben viszont a PKC aktiválódása ugyanazoknak a szabályozásban fontos szerepeknek a defoszforilációjához vezet, amelyek a kalcineurin célpontjai. Természetesen a PKC defoszforilációt okozó hatása közvetett. A szerin klasztert foszforiláló kináz gátlásán keresztül jön létre (ld. a "novel PKC"-t a 68. ábrán). A szerin klaszter nyugalmi foszforilációját fenntartó kináz gátlásának következtében, a citoplazma gyenge, kalcineurintól független foszfatáz aktivitása a szerin klaszter lassú defoszforilációját és a TRESK aktivációját eredményezi.

Az általunk vizsgált TRESK szabályozási mechanizmusok közül a PKC-függő TRESK aktiváció a leginkább közvetett mechanizmus. Ez a hatás a szerin klasztert foszforiláló kináz gátlásán alapul, amely különbözhet sejttípusonként. A PKC-függő TRESK aktiváció kialakulása tehát függ attól, hogy az adott natív sejt milyen új (novel) típusú PKC izoformákat és szerin klasztert foszforiláló kináz(oka)t tartalmaz. Ezzel szemben a PKA, MARK, kalcineurin és 14-3-3 szabályozó hatása közvetlen. A PKA, MARK és kalcineurin közvetlenül foszforilálja vagy defoszforilálja a TRESK-et, emellett a kalcineurin és 14-3-3 közvetlenül kötődik a csatornához. Tekintve, hogy a PKA, MARK, kalcineurin és 14-3-3 fehérjék szinte minden sejttípusban megtalálhatók, várható, hogy az általunk leírt molekuláris szabályozási mechanizmusok általánosan működnek azokban a natív sejtekben, amelyek a TRESK csatornát kifejezik.

### 6.3 Élettani és orvosi jelentőség

A fájdalom csillapítása alapvető orvosi feladat, amely gyakran nagy kihívást jelent. Egyes nehezen kezelhető fájdalom típusok, mint pl. a neuropátiás fájdalom, a migrén vagy a rosszindulatú daganatokhoz társuló fájdalom kezelése nem tekinthető véglegesen megoldottnak. Ezekben az esetekben az ismert módszerek gyakran nem eredményeznek megfelelő fájdalomcsillapítást. Ezért napjainkban is intenzív kutatás folyik tökéletesebb fájdalomcsillapító módszerek kifejlesztésére. A nociceptív primer szenzoros neuronok a legtöbb fájdalom típus kialakulásában szerepet játszanak, hiszen ezek továbbítják a fájdalomérző idegvégződés felől az ingerületet a központi idegrendszer irányába. A neuronok ingerlékenységének a  $K_{2P}$  csatornák meghatározó tényezői, ezért felvetődik a kérdés, hogyan érhető el fájdalomcsillapító hatás a háttér  $K^+$  áram aktiválásával [332-339].

A primer szenzoros neuronok fájdalomérzést szabályozó működésének vizsgálatát nehezíti a sejtcsoport nagyfokú heterogenitása, amely érvényesül a nociceptív szubpopuláción belül is. A fájdalomérzésért felelős elsődleges érző idegsejtek különböző csoportjaiban eltérő  $K_{2P}$  csatorna készlet expresszálódik, a közelmúltban elérhetővé vált egyedi sejt RNS szekvenálási eredmények szerint [12,13]. Az mRNS kifejeződés meglehetősen komplex mintázatot mutat a különböző típusú, fájdalomérzésben szerepet játszó neuronok között, azonban a csatornaműködés és az ennek megfelelő élettani funkció még ezeknek az összetett adatoknak a birtokában sem pontosan megítélhető. Az ionáram nagysága a plazmamembránban nem feltétlenül korrelál a csatorna mRNS mennyiséggel és az adott csatornatípus hozzájárulása a membránpotenciál szabályozásához jelentősen függ a sejttípusban kifejeződő egyéb ionáramok arányától. Az mRNS adatok hozzáférhetősége ellenére, ismereteink a  $K_{2P}$  csatornák fájdalomérzésben betöltött szerepéről korántsem teljesek és ezen a területen még jelentős fejlődés várható.

A primer szenzoros neuronok heterogenitását figyelmen kívül hagyó általános adatok rendelkezésre állnak a  $K_{2P}$  csatorna mRNS-ről és elektrofiziológiáról. Valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció (real-time RT-PCR) módszerrel a hátsó gyöki ganglionban a következő mRNS

mennyiségi viszonyokat állapították meg: TRESK > TRAAK > TREK2 = TWIK2 > TREK1 = THIK2 > TASK1 > TASK2 > THIK1 = TASK3 [340]. A TREK-2 bőséges kifejeződését fehérje szinten is kimutatták immuncitokémiával a C-típusú rosttal rendelkező nociceptív primer szenzoros neuronok sejtestjeiben. Ha a TREK-2 expressziót siRNS technikával visszaszorították ezekben a neuronokban, akkor depolarizáció jött létre [341]. További tanulmányok is igazolták a TREK-2 jelentőségét a kis sejtesttel rendelkező nociceptív neuronok membránpotenciáljának meghatározásában [90,342,343].

Sejtre tapasztott (cell-attached) patch clamp mérésekben a különböző  $K_{2P}$  csatornákat egyedi csatorna (single channel) vezetőképességük szerint különítették el kis sejtesttel rendelkező hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronok membránfoltjaiban [14]. Több mint 250 membránfolt vizsgálatával a következő sorrendet állítottak fel a csatorna megnyílások előfordulásáról testhőmérsékleten (37 °C): TREK-2 (69%), TRESK (16%), TREK-1 (12%) és TRAAK (3%). Szobahőmérsékleten (24 °C) a TRESK csatorna megnyílások fordultak elő leggyakrabban, mivel a termoszenzitív TREK-2 aktivitása ezen a hőmérsékleten csökkent [14]. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a nociceptív primer szenzoros neuronokban a TREK alcsalád tagjai és a TRESK csatorna jelentős mértékben hozzájárulnak a háttér  $K^+$  konduktanciához.

Annak ellenére, hogy a különböző  $K_{2P}$  alcsaládba tartozó TRESK és TREK csatorna alegységek alacsony (<20%) aminosav szekvencia azonosságot mutatnak, a közelmúltban kimutatták ezek heterodimerizációját [18]. A TRESK heterodimert képez a TREK-1 és TREK-2 alegységekkel egyaránt. A heterodimer csatorna egyszerre mutat olyan tulajdonságokat, amelyek a TREK homodimerekre jellemzők és olyanokat is, amelyek a TRESK homodimerekre. Így pl. az arachidonsav (10  $\mu$ M) aktiválja a heterodimert, ami a TREK csatornákra jellemző. Emellett viszont a TREK-1/TRESK heterodimerről kimutatták, hogy kalcium-függő aktivációt mutat, amelyet nyilván a TRESK alegység közvetít [18]. Ez alapján úgy tűnik tehát, hogy a kalcium-függő aktiváció akkor is létrejön, ha a csatornában csak egy TRESK alegység található. Tekintve, hogy a TRESK a DRG neuronokban a TREK-2 mellett fordul elő nagy mennyiségben, várható a TREK-2/TRESK heterodimer képződése *in*

*vivo*. Ezek a heterodimer csatornák nagyobb vezetőképességűek lehetnek, mint a TRESK homodimer és emellett kalcium-függő módon szabályozódhatnak az általunk TRESK homodimer kapcsán leírt mechanizmussal.

A jelentős TRESK expresszió tudatában, számos vizsgálat célozta a csatorna primer szenzoros neuronokban betöltött élettani szerepének tisztázását. TRESK génhiányos egér modellekben több munkacsoport is vizsgálta, hogy megjelenik-e jellemző fenotípus. A kezdeti kísérletsorozatok aránylag mérsékelt eltéréseket igazoltak a génhiányos egerekből izolált DRG neuronok elektrofiziológiai tulajdonságaiban, viszont élő állatban nem mutattak ki fenotípus változást a TRESK csatorna hiányában. A G339R funkcióvesztő mutáns génmódosított állat vizsgálatával megállapították, hogy a TRESK a teljes háttér  $K^+$  áram körülbelül 20%-át adja a DRG neuronban és a csatorna hiánya nem változtatja a nyugalmi membránpotenciál értékét. A TRESK csatornát nem tartalmazó sejtekben az akciós potenciál kiváltásához szükséges reobázis mintegy 60 %-kal csökkent, vagyis az áramzár (current clamp) méréssel meghatározott ingerlékenység növekedett [256]. A kis sejttel rendelkező, izolált DRG neuronok *in vitro* mérhető megnövekedett ingerlékenységét a TRESK gén hiányában azóta több tanulmány is megerősítette [15,16,259]. Egy másik vizsgálat szerint a TRESK génhiányos egérben 8 %-kal nőtt az izoflurán inhalációs anesztetikum minimális alveoláris koncentráció (MAC) értéke és az anesztetikumok alkalmazása után kb. 50 %-kal magasabb volt a mortalitás, mint a vad típusban. A kisebb túlélésre nem adtak magyarázatot és számos tesztrendszerben a TRESK génhiányos és vad típusú állat hasonlóan teljesített ezekben a vizsgálatokban [257].

A közelmúltban egymástól független tanulmányok egyértelmű fenotípust rendeltek a TRESK génhiányos egérhez [15,16,259]. Az egyik tanulmány élesen elkülönítette egymástól a hátsó gyöki (DRG) és trigeminális ganglion (TRG) neuronok választ, illetve az ezek ellátási területén megfigyelhető fenotípus eltéréseket a vad típusú és TRESK génhiányos állatban [15]. A TRESK hiánya a n. trigeminus ellátási területén növelte a fájdalmas hő, kémiai és mechanikai ingerekre adott reakciót, de a DRG neuronok ellátási területén szignifikáns különbségek nem voltak kimérhetők az alkalmazott tesztekkel [15].

A TRESK génhiányos (KO) egérben az OPAD (Orofacial Pain Assessment Device) berendezéssel mértek nagy különbséget a vad típusú (WT) állathoz képest. A KO egér jóval ritkábban nyalta meg a sűrített tejjel bevont forró (50 °C) felületet, mint a WT, azonban a semleges hőmérsékletű (33 °C-os) felületen felkínált finomság megegyező nyalási frekvenciát eredményezett a két csoportban. Ha a feji területen a bőrbe kapszaicint (az erős paprika hatóanyaga) injektáltak, vagy ha a bőrterületet acetonnal hűtötték, akkor a KO egér hosszabb ideig vagy többször törölgette az érintett területet, mint a WT. Hasonlóan fokozott, inger eltávolítására irányuló mozgás jelentkezett a TRESK KO állatban, ha a kapszaicin és gyulladásos mediátor koktél keverékét a dura materre juttatták (az erre adott választ csökkenti a migrén elleni gyógyszer sumatriptan). Mindemellett, a fájdalmas mechanikai ingerek hatását a feji területen von Frey filamentum módszerrel vizsgálva, a KO egér grammban mért 50%-os visszahúzási küszöb értéke csak mintegy harmada volt a WT egérének. Ezzel éles ellentétben, hasonló módszerrel a hátsó végtagon nem találtak különbséget a WT és KO állat között [15]. Ezek az eredmények egyértelműen mutatják, hogy a TRESK hiánya fokozott érzékenységet okoz a fájdalmas ingerekre a n. trigeminus ellátási területén.

Egy másik tanulmány számos funkcionális tesztet vizsgálta a DRG neuronok *in vivo* ingerlékenységét a TRESK génhiányos egérben [16]. Kifejezett különbséget tapasztaltak a KO és WT egér között a szőrszálakat ellátó alacsony küszöbű mechanoreceptor (nem fájdalomérző) neuronok érzékenységében (A $\delta$  rostokkal rendelkező "D-hair" receptor, kis sejttestű DRG neuronok, amelyek a legérzékenyebb mechanoreceptorok közé tartoznak). A szőrzet finom érintésre (cotton swab) a KO egér gyakrabban húzta el a hátsó végtagját, mint a vad típusú állat. A háti szőrzetre helyezett ragasztószalagot (back tape) a KO egér intenzívebben próbálta eltávolítani, mint a WT. Ezek az eredmények az alacsony küszöbű mechanoreceptor neuron érzékenység fokozódásának tulajdoníthatók [16].

Ugyanez a munkacsoport *in vitro* méréseket végzett TRG neuronokon és óriási különbséget tapasztaltak a WT és KO állatból izolált sejtek ingerlékenységében. Az áramzár (current clamp) mérésben öt percig adott

gyulladásos mediátor koktél hatására, a KO egérből izolált TRG neuronokban kb. hétszer nagyobb számú akciós potenciál jött létre, mint a WT sejtekben. Emellett a KO sejtek nagyobb hányada válaszolt kalcium jellel a stimulusra. [16]. A TRG neuronok fokozott *in vitro* ingerlékenysége jól megfelel a másik munkacsoport által élő állatban kimutatott fájdalmas ingerek iránti megnövekedett érzékenységnek a n. trigeminus ellátási területén [15].

Egy harmadik munkacsoport a TRESK gén hiányának másik funkcionális következményére hívta fel a figyelmet [259]. Többféle teszttel is azt az eredményt kapták, hogy a KO egér érzékenysége fokozott a károsító hideg ingerekre. A közismert forró lap teszt (hot plate test) analógiájára kialakított "hideg lap teszt" (2 °C laphőmérséklet) a KO állatban hamarabb váltott ki védekező magatartást (elugrás, vagy a talp megnyalása), mint a WT egerekben. Kifejezett különbséget találtak a WT és KO állatok között a még fájdalmasabb hideg ingert, szárazjeget (szilárd CO<sub>2</sub>, kb. -80 °C) alkalmazó tesztrendszerben (cold plantar assay, ahol a vékony üveglapon keresztül alkalmazott hűtőközeg mintegy 25 másodperc alatt csökkentette az egér talpának hőmérsékletét irreverzibilis szövetkárosító értékre). A viselkedési tesztekkel jó összhangban, a KO egérből származó *ex vivo* bőr-ideg preparátumban fokozatos hűtésre (cold ramp) a C-típusú rostok érzékenyebben válaszoltak, mint a WT készítményen. Mindemellett az oxaliplatin kemoterápiás szer, amely a betegekben gyakran hideg allodynia kialakulását okozza, a TRESK génhiányos állatban nem befolyásolta a hideg iránti érzékenységet, szemben a WT állatban tapasztalható, irodalomból jól ismert egyértelmű hatással. A WT állat hideg iránti érzékenysége oxaliplatin kezelést követően fokozódott arra a kóros értékre, amely a KO állatban a kezeléstől függetlenül jellemző volt. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TRESK csatornát kifejező primer szenzoros neuronok egy csoportja szerepet játszik a fájdalmas hideg inger érzékelésében [259].

Tekintve a n. trigeminus által ellátott területen a TRESK teljes hiányában jelentkező nagymértékű és több modalításra kiterjedő fájdalomérzés fokozódást az egér modellben, érthetővé válik, hogy a TRESK áram csökkenésnek hasonló módon szerepe lehet emberben a migrén kialakulásában. Valójában azonban a

TRESK génhiányos egér fenotípus leírása előtt egy humán genetikai vizsgálat már felvettette a lehetőségét, hogy a TRESK csatorna mutációja migrénes fejfájást okoz [17]. Egy nagy család nyolc tagjában a TRESK F139WfsX24 kereteltolódásos mutációja kapcsolatosan fordult elő az aurával járó migrénnel, viszont a mutációt nem hordozó nyolc családtagban migrénes fejfájás nem alakult ki. A mutáns csatornával heterolog rendszerben végzett kísérletek azt mutatták, hogy a mutáció hatására keletkező csonkolt TRESK fehérje domináns negatív hatást fejt ki a normális TRESK alegységre és ez magyarázhatja a heterozigóta formában jelenlévő mutáns allél betegségokozó tulajdonságát [17].

Habár a ritka TRESK csatorna mutáció és migrén kapcsolatát elsőként leíró közlemény a rangos *Nature Medicine* folyóiratban jelent meg, az eredményt csaknem egy évtizedig nagy bizonytalanság övezte. Az összefüggést leíró munkacsoport ugyanis nem sokkal később közölte (és mások megerősítették), hogy egy másik TRESK inaktiváló mutáció (C110R) heterozigóta formában aránylag gyakori és nem okoz migrént, pedig heterolog rendszerben a kereteltolódásos mutációhoz hasonló domináns negatív hatást fejt ki az ép TRESK áramára [258,344]. Nem lehetett tudni, hogy arról van-e szó, hogy a különböző domináns negatív hatást kifejtő TRESK mutánsok sem ekvivalensek és csak bizonyos változatok okoznak migrént, vagy pedig az alapfelvetés a TRESK és migrén kapcsolatáról téves.

A dilemmából kivezető helyes utat elsőként overexpressziós kísérletek mutatták meg. A vad típusú TRESK overexpressziója az egérből izolált DRG vagy TRG neuronokban hiperpolarizáló hatásának bizonyult és csökkentette az idegsejtek ingerlékenységét [317,326]. A kereteltolódásos mutációt tartalmazó TRESK alegység overexpressziója viszont fokozta az TRG neuronok ingerlékenységét, ami jól magyarázható a heterolog rendszerben megfigyelhető domináns negatív hatással [316]. Meglepő módon, azonos kísérleti körülmények között, a C110R mutáns TRESK overexpressziója nem növelte a neuronok ingerlékenységét [344]. Ebből következik, hogy az F139WfsX24 kereteltolódásos és C110R mutációk hatása a natív TRG környezetben eltérő, annak ellenére, hogy heterolog expressziós rendszerben mindkét változat hasonlóan létrehozza a domináns negatív hatást a TRESK áramra.

A TRESK/TREK heterodimerizáció felismerését követően, jelentős különbséget találtak az F139WfsX24 és C110R mutáns TRESK alegységek TREK áramra kifejtett hatásában heterolog expressziós rendszerben [18]. A kereteltolódásos mutáns erőteljes domináns negatív hatást fejtett ki a TREK-1 és TREK-2 alegységekre is a TRESK mellett, ezzel szemben viszont a C110R mutáns csak a TRESK áramot védte ki, de a TREK csatornákra nem hatott. Az F139WfsX24 mutáció hatására, alternatív transzláció iniciációval keletkezik egy C-terminális TRESK fragmens is, a kereteltolódásos mutációknál szokásos N-terminális csonkolt darab mellett. Azt találták, hogy az N-terminális TRESK fehérje fragmens a TRESK-re, a C-terminális TRESK fragmens viszont a TREK csatornákra fejt ki domináns negatív hatást. A TRESK és TREK csatornákra együttesen kifejtett domináns negatív hatás olyan mértékben csökkenti a szenzoros neuron háttér  $K^+$  csatorna készletét, amit az már nem tud kompenzálni, és az idegsejt kórosan magas aktivitását, akciós potenciál frekvenciáját eredményezi. Az ugyan nem világos, hogy a teljes hosszúságú C110R mutáns miért nem okoz domináns negatív hatást a TREK csatornákra, de mindenesetre elgondolkodtató, hogy a különböző típusú TRESK mutációknak lényegesen eltérő funkcionális következményei lehetnek *in vivo* [18].

A molekuláris mechanizmusok felderítését célzó genetikai vizsgálatokból gyakran csak a mutáció és a kórállapot kapcsoltsága mondható ki biztosan, de az ok-okozati összefüggés inkább csak valószínűsíthető. Néhány hónappal ezelőtt azonban megjelent egy közlemény, amelyben a legmodernebb technológiai arzenált felvonultatva bizonyítják a TRESK F139WfsX24 mutáció és az szenzoros neuronok ingerlékenysége közötti ok-okozati összefüggést [260]. A kereteltolódásos mutációt hordozó betegek bőrbíopsziájából, fibroblasztokból indukált pluripotens őssejteket (iPSC) készítettek, majd ezekből nociceptív szenzoros neuronokat differenciáltattak *in vitro*. A migrénben szenvedő betegekből előállított neuronoknak fokozott volt az ingerlékenységük az egészséges kontroll személyekből készített sejtekhez képest. A TRESK mutáció korrekciója CRISPR-Cas9 genomszerkesztési eljárással visszaállította a normális ingerlékenységet az iPSC eredetű nociceptív szenzoros

neuronokban [260]. Így tehát az F139WfsX24 mutáció okozza a fokozott ingerlékenységet és nem a mutációval kapcsolatos öröklődő egyéb genetikai determináns(ok).

A C110R mutációt hordozó (nem migrénes) személyek iPSC-ből differenciáltatott nociceptív szenzoros neuronjai normális, a kontroll személyekével megegyező, ingerlékenységet mutattak [260]. Mindemellett, a TRESK-nek tulajdonított, TPA (tetrapentil-ammónium) érzékeny áram komponens sem különbözött a C110R mutációt hordozó neuronokban a kontrolltól. Ez azt sugallja, hogy a C110R mutáció jelenlétében a másik ép allél biztosítja a megfelelő mennyiségű funkcióképes TRESK alegység expressziót. Vagyis úgy tűnik, hogy a szenzoros neuronokban a C110R mutáns nem csak a TREK csatornákra, hanem a TRESK-re is gyengébb domináns negatív hatást fejt ki, mint az F139WfsX24 mutáns [260]. A fenti eredmények alapján az F139WfsX24 mutáció funkcionális hatása egyértelmű. További vizsgálatok szükségesek viszont annak megítélésére, hogy a fokozott neuronális ingerlékenység kialakulásáért milyen mértékben felelős a TRESK mennyiség csökkenése, illetve a TREK csatorna áramára kifejtett domináns negatív hatás.

Az elmúlt tíz év nemzetközi erőfeszítéseinek eredményeként lassan kezdjük megérteni a TRESK jelentőségét a migrén kialakulásában. Emellett azonban felvetették a TRESK hozzájárulását a neuropátiás fájdalom [321,326,345,346], a trigeminális neuralgia [327], a csontmetasztázis okozta fájdalom [347], a gyulladásos és nociceptív fájdalom [311,340], a vagus afferens diszfunkció [309,348,349] és más fájdalom típusok kialakulásában [332,334,335,350,351]. Nyilvánvalóan sok kutatómunka szükséges még a TRESK pontos szerepének felderítésére ezekben az állapotokban, illetve annak megállapítására, hogy felhasználható-e a csatorna aktivitás farmakológiai módosítása újabb fájdalomcsillapító módszerek kidolgozására.

Az eddigi vizsgálatokban nagy kihívást jelentett a TRESK funkcióvesztő mutációk és a migrén patofiziológiája közötti összefüggés felismerése. Tudomásunk szerint eddig egyetlen tanulmány sem vállalkozott a normál TRESK alegység kóros szabályozásának módszeres vizsgálatára a fájdalommal járó állapotokban. Tekintve azonban, hogy a kalcineurin-függő

szabályozás a TRESK [2,7] és TRESK/TREK heterodimer [18] aktivitást alapvetően meghatározza, nemcsak heterolog rendszerekben, hanem primer szenzoros neuronokban is [311], várható, hogy ennek kisiklása a TRESK alegység mutációjához mérhető kóros eltérést okoz. Ennek a gondolatmenetnek megfelelően vetődött fel a TRESK lehetséges szerepe a calcineurin-inhibitorok által okozott fájdalom szindróma (calcineurin-inhibitor induced pain syndrome, CIPS), illetve az ilyen gyógyszerek által okozott fejfájás kialakulásában [332,347,350,351]. A hipotézis szerint a szervtranszplantáció után immunszuppresszív céllal alkalmazott ciklosporin A és tacrolimus (FK506) gátolja a calcineurint a primer szenzoros neuronokban is és ez a TRESK fokozott foszforilációjához és gátlásához vezet. A háttér  $K^+$  áram csökkenés nociceptív neuron ingerlékenység fokozódást és a betegek egy hányadában fájdalmat okoz.

Jól megalapozott ismeret, hogy a protein kináz A (PKA) fontos szerepet játszik a nociceptív neuronok érzékenységének szabályozásában és kóros körülmények között a hiperalgécia kialakulásában [352,353]. A cAMP/PKA jelátvitel növeli a tranziens-receptor-potenciál vanilloid-receptor 1 (TRPV1) nem-szelektív kationcsatorna áramát, amely fontos receptor funkciót tölt be a fájdalomérzésben. Emellett, pl. prosztaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) gyulladásos mediátor hatására, a PKA általi foszforiláció csökkenti a TRPV1 deszenzitizálódását [354,355]. Serkentő hatást fejt ki a PKA a nociceptív primer szenzoros neuronok feszültségfüggő  $Na^+$  csatornáira is [356]. Hozzájárulhat az általános ingerlékenység fokozó hatáshoz a TRESK csatorna PKA általi gátlása is, amennyiben ez létrejön primer szenzoros neuronokban.

A doktori értekezésben bemutatott eredmények alapján egyértelmű, hogy *Xenopus* petesejtekben a  $PKC_{\eta}$  és  $PKC_{\epsilon}$  többszörösére aktiválja a humán TRESK csatorna áramát. A  $PKC_{\eta}$  aránylag kis mennyiségben fejeződik ki mRNS szinten a nociceptív érzőidegsejtekben [12], azonban a  $PKC_{\epsilon}$  izoforma jól ismert közvetítője a gyulladásos, neuropátiás és a rosszindulatú daganathoz társuló fájdalomnak a hátsógyöki és trigeminális ganglion neuronokban [357-361]. Többszörösen megerősített adatok szerint, a  $PKC_{\epsilon}$  aktiválódik különböző állatkísérletes fájdalom modellekben és hozzájárul a hiperalgécia és krónikus

fájdalom kialakulásához. A PKC $\epsilon$  foszforilálja a TRPV1 csatornát és ennek aktivációjával is fokozza a nociceptív neuronok ingerlékenységét [361,362].

A PKC $\epsilon$  döntő meghatározója a fájdalomérző receptor előhangolásnak (nociceptor priming, összefoglalóként ld. a [363] könyvfejezetet). A fájdalomérző receptor előhangolás kísérletes vizsgálatára carrageenan injekcióval gyulladásos fájdalmat hoznak létre. Ez átmeneti hiperalgéziát okoz. Ha viszont a hiperalgédia lecsengése után, azonos lokalizációban prosztaglandin E<sub>2</sub>-t (PGE<sub>2</sub>) injekciónak, akkor tartós hiperalgédia jelentkezik, amely egy naptól akár hetekig is fennmaradhat. Carrageenan érzékenyítés nélkül a PGE<sub>2</sub> injekció nem okoz tartós hiperalgéziát. A hosszútávú érzékenyítés a PKC $\epsilon$  fokozott működése miatt jön létre, a PKC $\epsilon$  gátlása kivédi [358,364], a PKC $\epsilon$  kísérletes aktiválása pedig carrageenan injekció nélkül is kiváltja [365].

Szemben a PKC $\epsilon$  aktiválódásával gyulladásos fájdalom modellekben, tartós lekötés által okozott idegkárosodásban (chronic constriction injury, CCI) leírták, hogy a PKC $\epsilon$  aktivitás a csökkenés irányába szabályozódik [366]. Valószínűleg ebben a kivételes esetben sem kísérleti hibáról van szó, mert ez a munkacsoport is azt találta, hogy a carrageenan vagy komplett Freund adjuváns injekció PKC $\epsilon$  aktiválódást okoz, a krónikus idegkonstrikcióban tapasztalt gátlástól eltérően [366].

Ha a nociceptív primer szenzoros neuronban a TRESK hasonlóan aktiválódik PKC $\epsilon$  hatására, mint a *Xenopus* petesejt heterolog expressziós rendszerben, akkor a K<sup>+</sup> áram növekedése hozzájárulhat a membránpotenciál stabilizálásához (pl. miközben a PKC $\epsilon$ -függő foszforiláció érzékenyíti a TRPV1 csatornát [362]). A PKC $\epsilon$ -függő TRESK aktiváció mérsékelheti a hiperalgéziát gyulladásos fájdalomban, vagyis fékként működhet, mivel a TRESK áram növekedés csökkenti a szenzoros neuron ingerlékenységét. A krónikus nociceptor előhangolás (priming) során a PKC $\epsilon$ -függő TRESK aktiváció csökkentheti az előhangoló stimulus okozta hiperalgéziát, annak átmeneti jellegét biztosítva, majd a PGE<sub>2</sub> inger a TRESK áram PKA-függő gátlásával ezt az ingerlékenység csökkentő hatást ellensúlyozhatja. A krónikus idegkonstrikciós modellben a csökkent PKC $\epsilon$  aktivitás, a TRESK gátláson keresztül, megnövelheti a nociceptív szenzoros neuron ingerlékenységét.

A fenti bekezdésekben felvázolt hipotézisek illusztrálják, hogy a TRESK csatorna szabályozás általános molekuláris szintű mechanizmusainak felderítése milyen módon ad keretet a további gondolkodás, a továbbvezető idegtudományi vizsgálatok, illetve az ezt követő alkalmazott kutatás és fejlesztés számára.

## 7. AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

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  $\eta$  és  $\epsilon$ ) azáltal 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.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetemet Prof. Enyedi Péternek, TDK és PhD témavezetőmnek, amiért laborjába 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 támogatásért. 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 előreívő javaslatait. Prof. Geiszt Miklós és Prof. Várnai Péter köszönetet érdemelnek a pályázatokkal kapcsolatos értékes tanácsaikért és a tisztán tudományos megközelítés iránti példamutató elkötelezettségük miatt.

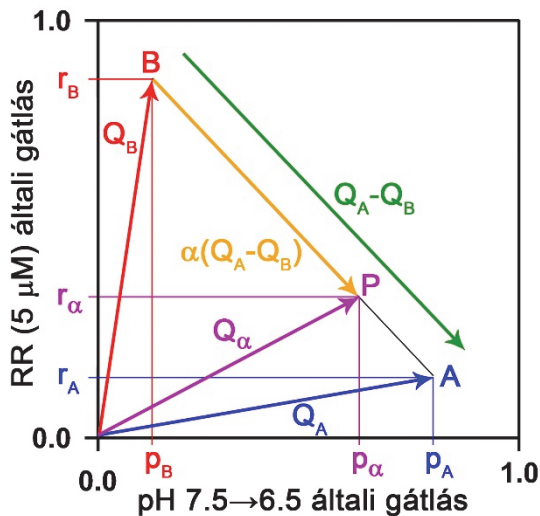
Köszönöm dr. Braun Gabriella, Pergel Enikő és dr. Lengyel Miklós PhD hallgatók odaadó munkáját, illetve Vuity Drazsen, Nemcsics Balázs és Bozsaki Péter TDK hallgatók lelkes tevékenységét. Köszönettel tartozom továbbá az Élettani Intézet jelenlegi és korábbi munkatársainak azért az elfogadó, segítőkész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

Hálás vagyok laboratóriumunk asszisztensnőinek 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 asszisztensnőinknek 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.

## 9. FÜGGELÉK



**Állítás:** Ha csak a két homodimer van jelen különböző arányokban, akkor az ezeknek megfelelő keverék áramok pontjai, a pH vs. RR gátlás grafikonon, a két magában kifejezett homodimer áramának pontjait összekötő szakaszon található.

**Jelölések:** Jelölje az A alegységekből felépülő homodimerek áramát  $I_A$ , a B alegység homodimereit pedig  $I_B$ . Az  $I_X$

áram pH érzékenységet jelölje  $p_X$ , a RR iránti érzékenységet pedig  $r_X$ , ahol  $X \in \{A, B\}$  és  $p_X$  és  $r_X$  jellemzően 0 és 1 közötti számok, amelyek a gátlódó áram frakciót jelentik. Legyenek  $Q_A = (p_A, r_A)$  és  $Q_B = (p_B, r_B)$  a homodimereknek megfelelő A és B pontokba mutató helyvektorok a pH vs. RR gátlás síkon. Vegyünk egy olyan mindkét alegységet koexpresszáló petesejtet, amelyben az A alegységek homodimerei  $I_A$  áramot, a B alegységek homodimerei pedig  $I_B$  áramot adnak. Ekkor a teljes áram nagysága a sejtben  $I_A + I_B$ . Az  $I_A$  áram részarányát jelöljük  $\alpha$ -val, ahol  $\alpha = I_A / (I_A + I_B)$ . A keverék áram pH érzékenységet jelölje  $p_\alpha$ , a RR iránti érzékenységet  $r_\alpha$ . Az áramnak megfelelő pont a pH vs. RR gátlás koordináta rendszerben legyen P, ahova a  $Q_\alpha = (p_\alpha, r_\alpha)$  helyvektor mutat.

**Bizonyítás:** Az  $I_A$  áramból  $I_{ApA}$  komponens gátlódik a savanyítás hatására, az  $I_B$  áramból pedig  $I_{BpB}$ . Emiatt a teljes gátlódó áram nagysága  $I_{ApA} + I_{BpB}$ , a keverék áram pH érzékenysége pedig  $p_\alpha = (I_{ApA} + I_{BpB}) / (I_A + I_B)$ . Teljesen hasonló okból a keverék áram RR érzékenysége  $r_\alpha = (I_{ArA} + I_{BrB}) / (I_A + I_B)$ . Vegyük azonban észre, hogy  $p_\alpha = (I_{ApA} + I_{BpB}) / (I_A + I_B) = \alpha p_A + (1 - \alpha) p_B = p_B + \alpha(p_A - p_B)$ . Hasonlóan  $r_\alpha = r_B + \alpha(r_A - r_B)$ . A B pontból A-ba mutató vektor a helyvektorok különbsége  $Q_A - Q_B = (p_A - p_B, r_A - r_B)$ , ezért a P pont helyvektora  $Q_\alpha = (p_\alpha, r_\alpha) = (p_B + \alpha(p_A - p_B), r_B + \alpha(r_A - r_B)) = Q_B + \alpha(Q_A - Q_B)$ . Ez viszont azt jelenti, hogy a P pontba eljuthatunk úgy is, hogy elmegyünk a B pontba, majd onnan az A pont felé haladunk, megtéve az A és B közötti távolság  $\alpha$  hányadát. Ezzel beláttuk, hogy a P pont az AB szakaszra esik.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., Furuichi, K. (2003) A novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem* **278**, 27406-27412
2. Czirják, G., Tóth, Z. E., Enyedi, P. (2004) The two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J. Biol. Chem* **279**, 18550-18558
3. Kang, D., Mariash, E., Kim, D. (2004) Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *J. Biol. Chem* **279**, 28063-28070
4. 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<sup>+</sup> channel, TRESK. *J. Biol. Chem* **281**, 14677-14682
5. Czirják, G., Vuity, D., Enyedi, P. (2008) Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J. Biol. Chem* **283**, 15672-15680
6. Czirják, G., Enyedi, P. (2010) TRESK background K<sup>+</sup> channel is inhibited by phosphorylation via two distinct pathways. *J. Biol. Chem* **285**, 14549-14557
7. Braun, G., Nemcsics, B., Enyedi, P., Czirják, G. (2011) TRESK background K<sup>+</sup> channel is inhibited by PAR-1/MARK microtubule affinity-regulating kinases in *Xenopus* oocytes. *PLoS. One* **6**, e28119
8. 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
9. Czirják, G., Enyedi, P. (2014) The LQLP calcineurin docking site is a major determinant of the calcium-dependent activation of human TRESK background K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **289**, 29506-29518
10. Manteniotis, S., Lehmann, R., Flegel, C., Vogel, F., Hofreuter, A., Schreiner, B. S., Altmüller, J., Becker, C., Schobel, N., Hatt, H., Gisselmann, G. (2013) Comprehensive RNA-Seq expression analysis of sensory ganglia with a focus on ion channels and GPCRs in Trigeminal ganglia. *PLoS One* **8**, e79523
11. Flegel, C., Schobel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., Gisselmann, G. (2015) RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. *PLoS One* **10**, e0128951
12. Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lonnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggstrom, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P. V., Linnarsson, S., Ernfors, P. (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* **18**, 145-153
13. LaPaglia, D. M., Sapio, M. R., Burbelo, P. D., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Raithel, S. J., Ramsden, C. E., Iadarola, M. J., Mannes, A. J. (2018) RNA-Seq investigations of human post-mortem trigeminal ganglia. *Cephalalgia* **38**, 912-932
14. Kang, D., Kim, D. (2006) TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K<sup>+</sup> channels in dorsal root ganglion neurons. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **291**, C138-C146

15. Guo, Z., Qiu, C. S., Jiang, X., Zhang, J., Li, F., Liu, Q., Dhaka, A., Cao, Y. Q. (2019) TRESK K(+) Channel Activity Regulates Trigeminal Nociception and Headache. *eNeuro* **6**
16. Weir, G. A., Pettingill, P., Wu, Y., Duggal, G., Ilie, A. S., Akerman, C. J., Cader, M. Z. (2019) The Role of TRESK in Discrete Sensory Neuron Populations and Somatosensory Processing. *Front Mol Neurosci* **12**, 170
17. Lafreniere, R. G., Cader, M. Z., Poulin, J. F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafreniere, F., McLaughlan, S., Dube, M. P., Marcinkiewicz, M. M., Ramagopalan, S., Ansorge, O., Brais, B., Sequeiros, J., Pereira-Monteiro, J. M., Griffiths, L. R., Tucker, S. J., Ebers, G., Rouleau, G. A. (2010) A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat. Med* **16**, 1157-1160
18. Royal, P., Andres-Bilbe, A., Avalos Prado, P., Verkest, C., Wdziekonski, B., Schaub, S., Baron, A., Lesage, F., Gasull, X., Levitz, J., Sandoz, G. (2019) Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK. *Neuron* **101**, 232-245 e236
19. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1947) Potassium leakage from an active nerve fibre. *J Physiol* **106**, 341-367
20. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500-544
21. Goldman, D. E. (1943) Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J Gen Physiol* **27**, 37-60
22. Hodgkin, A. L., Katz, B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* **108**, 37-77
23. Atkinson, N. S., Robertson, G. A., Ganetzky, B. (1991) A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* **253**, 551-555
24. Frech, G. C., VanDongen, A. M., Schuster, G., Brown, A. M., Joho, R. H. (1989) A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature* **340**, 642-645
25. Timpe, L. C., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Papazian, D. M., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1988) Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* **331**, 143-145
26. Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P. A., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1993) Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* **364**, 802-806
27. Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J* **15**, 1004-1011
28. Enyedi, P., Czirják, G. (2010) Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* **90**, 559-605
29. Loukin, S. H., Kuo, M. M., Zhou, X. L., Haynes, W. J., Kung, C., Saimi, Y. (2005) Microbial K<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* **125**, 521-527
30. Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., MacKinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* **414**, 37-42

31. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**, 523-526
32. Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., Goldstein, S. A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-695
33. Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. (1996) A pH-sensitive yeast outward rectifier K<sup>+</sup> channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem* **271**, 4183-4187
34. Renigunta, V., Schlichthorl, G., Daut, J. (2015) Much more than a leak: structure and function of K(2)p-channels. *Pflugers Arch* **467**, 867-894
35. Miller, A. N., Long, S. B. (2012) Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science* **335**, 432-436
36. Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K. A., Minor, D. L., Jr. (2017) K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature* **547**, 364-368
37. Dong, Y. Y., Pike, A. C., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., Ruda, G. F., Clausen, M. V., Cao, L., Brennan, P. E., Burgess-Brown, N. A., Sansom, M. S., Tucker, S. J., Carpenter, E. P. (2015) K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* **347**, 1256-1259
38. Brohawn, S. G., del Marmol, J., MacKinnon, R. (2012) Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K<sup>+</sup> ion channel. *Science* **335**, 436-441
39. Brohawn, S. G., Campbell, E. B., MacKinnon, R. (2014) Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K<sup>+</sup> channel. *Nature* **516**, 126-130
40. Lolicato, M., Riegelhaupt, P. M., Arrigoni, C., Clark, K. A., Minor, D. L., Jr. (2014) Transmembrane helix straightening and buckling underlies activation of mechanosensitive and thermosensitive K(2P) channels. *Neuron* **84**, 1198-1212
41. Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* **15**, 6854-6862
42. Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
43. Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1997) TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* **16**, 5464-5471
44. Leonoudakis, D., Gray, A. T., Winegar, B. D., Kindler, C. H., Harada, M., Taylor, D. M., Chavez, R. A., Forsayeth, J. R., Yost, C. S. (1998) An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci* **18**, 868-877
45. Hille, B., Schwarz, W. (1978) Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol* **72**, 409-442
46. Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin, L. G., Preisig-Muller, R., Daut, J., Karschin, A., Derst, C. (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histiding as pH sensor. *J. Biol. Chem* **275**, 16650-16657

47. Maingret, F., Honore, E., Lazdunski, M., Patel, A. J. (2002) Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 339-346
48. Patel, A. J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* **17**, 4283-4290
49. Kim, Y., Bang, H., Gnatenco, C., Kim, D. (2001) Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K<sup>+</sup> channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflugers Arch* **442**, 64-72
50. Bockenhauer, D., Zilberberg, N., Goldstein, S. A. (2001) KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nat Neurosci* **4**, 486-491
51. Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E. (2000) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* **275**, 10128-10133
52. Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., Honore, E. (2005) A phospholipid sensor controls mechanogating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. *EMBO J* **24**, 44-53
53. Sandoz, G., Thummler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., Lesage, F. (2006) AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J* **25**, 5864-5872
54. Kim, D. M., Nimigean, C. M. (2016) Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**
55. Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B. L., Tucker, S. J., Rapedius, M., Baukrowitz, T. (2016) A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell* **164**, 937-949
56. Kim, Y., Bang, H., Kim, D. (1999) TBAK-1 and TASK-1, two-pore K(+) channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am J Physiol* **277**, H1669-1678
57. Kim, Y., Bang, H., Kim, D. (2000) TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J. Biol. Chem* **275**, 9340-9347
58. Lopes, C. M., Gallagher, P. G., Buck, M. E., Butler, M. H., Goldstein, S. A. (2000) Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J Biol Chem* **275**, 16969-16978
59. Kim, D., Gnatenco, C. (2001) TASK-5, a new member of the tandem-pore K(+) channel family. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 923-930
60. Ashmole, I., Goodwin, P. A., Stanfield, P. R. (2001) TASK-5, a novel member of the tandem pore K<sup>+</sup> channel family. *Pflugers Arch* **442**, 828-833
61. Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Muller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K. H., Daut, J., Karschin, A. (2001) Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol Cell Neurosci* **18**, 632-648

62. Cui, Y. L., Holt, A. G., Lomax, C. A., Altschuler, R. A. (2007) Deafness associated changes in two-pore domain potassium channels in the rat inferior colliculus. *Neuroscience* **149**, 421-433
63. Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N., Lazdunski, M. (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K<sup>+</sup> channel from human kidney. *J. Biol. Chem* **273**, 30863-30869
64. Niemeyer, M. I., Gonzalez-Nilo, F. D., Zuniga, L., Gonzalez, W., Cid, L. P., Sepulveda, F. V. (2007) Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K<sup>+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 666-671
65. Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Pena-Munzenmayer, G., Sepulveda, F. V. (2010) Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J Biol Chem* **285**, 16467-16475
66. Cid, L. P., Roa-Rojas, H. A., Niemeyer, M. I., Gonzalez, W., Araki, M., Araki, K., Sepulveda, F. V. (2013) TASK-2: a K2P K(+) channel with complex regulation and diverse physiological functions. *Front Physiol* **4**, 198
67. Girard, C., Duprat, F., Terrenoire, C., Tinel, N., Fosset, M., Romey, G., Lazdunski, M., Lesage, F. (2001) Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **282**, 249-256
68. Decher, N., Maier, M., Dittrich, W., Gassenhuber, J., Bruggemann, A., Busch, A. E., Steinmeyer, K. (2001) Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett* **492**, 84-89
69. Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., Lazdunski, M. (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem* **275**, 28398-28405
70. Kim, Y., Gnatenco, C., Bang, H., Kim, D. (2001) Localization of TREK-2 K<sup>+</sup> channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. *Pflugers Arch* **442**, 952-960
71. Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E. (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem* **274**, 26691-26696
72. Honore, E., Maingret, F., Lazdunski, M., Patel, A. J. (2002) An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. *EMBO J* **21**, 2968-2976
73. Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., Lesage, F. (2009) Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 14628-14633
74. Bang, H., Kim, Y., Kim, D. (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *J. Biol. Chem* **275**, 17412-17419
75. Lesage, F., Maingret, F., Lazdunski, M. (2000) Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett* **471**, 137-140

76. Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E. (1999) TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **274**, 1381-1387
77. Lauritzen, I., Chemin, J., Honore, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M., Jane Patel, A. (2005) Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep* **6**, 642-648
78. Berrier, C., Pozza, A., de Lacroix de Lavalette, A., Chardonnet, S., Mesneau, A., Jaxel, C., le Maire, M., Ghazi, A. (2013) The purified mechanosensitive channel TREK-1 is directly sensitive to membrane tension. *J Biol Chem* **288**, 27307-27314
79. Brohawn, S. G., Su, Z., MacKinnon, R. (2014) Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3614-3619
80. Brohawn, S. G. (2015) How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann N Y Acad Sci* **1352**, 20-32
81. Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., Lazdunski, M. (1998) A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* **17**, 3297-3308
82. Danthi, S., Enyeart, J. A., Enyeart, J. J. (2003) Modulation of native TREK-1 and Kv1.4 K<sup>+</sup> channels by polyunsaturated fatty acids and lysophospholipids. *J Membr Biol* **195**, 147-164
83. Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E. (2000) TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J* **19**, 2483-2491
84. Kang, D., Choe, C., Kim, D. (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* **564**, 103-116
85. Schneider, E. R., Anderson, E. O., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N. (2014) Temperature sensitivity of two-pore (K2P) potassium channels. *Curr Top Membr* **74**, 113-133
86. Lamas, J. A., Rueda-Ruzafa, L., Herrera-Perez, S. (2019) Ion Channels and Thermosensitivity: TRP, TREK, or Both? *Int J Mol Sci* **20**, E2371
87. Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524
88. Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noel, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., Eschalier, A., Lazdunski, M. (2006) TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* **25**, 2368-2376
89. Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., Lazdunski, M. (2009) The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* **28**, 1308-1318
90. Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., Eschalier, A., Lazdunski, M., Noel, J. (2014) Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* **155**, 2534-2544
91. Wechselberger, M., Wright, C. L., Bishop, G. A., Boulant, J. A. (2006) Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal thermosensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R518-529

92. Mathie, A. (2007) Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *J. Physiol* **578**, 377-385
93. Kang, D., Han, J., Kim, D. (2006) Mechanism of inhibition of TREK-2 (K2P10.1) by the Gq-coupled M3 muscarinic receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C649-656
94. Murbartian, J., Lei, Q., Sando, J. J., Bayliss, D. A. (2005) Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J. Biol. Chem* **280**, 30175-30184
95. Kreneisz, O., Benoit, J. P., Bayliss, D. A., Mulkey, D. K. (2009) AMP-activated protein kinase inhibits TREK channels. *J. Physiol* **587**, 5819-5830
96. 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<sup>+</sup> channels. *J Physiol* **564**, 117-129
97. Koh, S. D., Monaghan, K., Sergeant, G. P., Ro, S., Walker, R. L., Sanders, K. M., Horowitz, B. (2001) TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. *J Biol Chem* **276**, 44338-44346
98. Sanders, K. M., Koh, S. D. (2006) Two-pore-domain potassium channels in smooth muscles: new components of myogenic regulation. *J Physiol* **570**, 37-43
99. Lloyd, E. E., Marrelli, S. P., Bryan, R. M., Jr. (2009) cGMP does not activate two-pore domain K<sup>+</sup> channels in cerebrovascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**, H1774-1780
100. Sandoz, G., Tardy, M. P., Thummler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., Lesage, F. (2008) Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K<sup>+</sup> channel expression and trafficking. *J Neurosci* **28**, 8545-8552
101. O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N., Goldstein, S. A. (2002) Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577-588
102. Rajan, S., Preisig-Muller, R., Wischmeyer, E., Nehring, R., Hanley, P. J., Renigunta, V., Musset, B., Schlichthorl, G., Derst, C., Karschin, A., Daut, J. (2002) Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol* **545**, 13-26
103. Zuzarte, M., Heusser, K., Renigunta, V., Schlichthorl, G., Rinne, S., Wischmeyer, E., Daut, J., Schwappach, B., Preisig-Muller, R. (2009) Intracellular traffic of the K<sup>+</sup> channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J. Physiol* **587**, 929-952
104. Kilisch, M., Lytovchenko, O., Schwappach, B., Renigunta, V., Daut, J. (2015) The role of protein-protein interactions in the intracellular traffic of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *Pflugers Arch* **467**, 1105-1120
105. Renigunta, V., Yuan, H., Zuzarte, M., Rinne, S., Koch, A., Wischmeyer, E., Schlichthorl, G., Gao, Y., Karschin, A., Jacob, R., Schwappach, B., Daut, J., Preisig-Muller, R. (2006) The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic* **7**, 168-181
106. O'Kelly, I., Goldstein, S. A. (2008) Forward Transport of K2p3.1: mediation by 14-3-3 and COPI, modulation by p11. *Traffic* **9**, 72-78

107. Renigunta, V., Fischer, T., Zuzarte, M., Kling, S., Zou, X., Siebert, K., Limberg, M. M., Rinne, S., Decher, N., Schlichthorl, G., Daut, J. (2014) Cooperative endocytosis of the endosomal SNARE protein syntaxin-8 and the potassium channel TASK-1. *Mol Biol Cell* **25**, 1877-1891
108. Fernandez-Orth, J., Ehling, P., Ruck, T., Pankratz, S., Hofmann, M. S., Landgraf, P., Dieterich, D. C., Smalla, K. H., Kahne, T., Seebohm, G., Budde, T., Wiendl, H., Bittner, S., Meuth, S. G. (2017) 14-3-3 Proteins regulate K2P 5.1 surface expression on T lymphocytes. *Traffic* **18**, 29-43
109. Anazco, C., Pena-Munzenmayer, G., Araya, C., Cid, L. P., Sepulveda, F. V., Niemeyer, M. I. (2013) G protein modulation of K2P potassium channel TASK-2 : a role of basic residues in the C terminus domain. *Pflugers Arch* **465**, 1715-1726
110. Budde, T., Daut, J., Kurtz, A., Pape, H. C. (2015) Two-pore-domain potassium channels: regulators of many cellular functions. *Pflugers Arch* **467**, 865-866
111. Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D., Lesage, F. (2015) The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol* **593**, 2587-2603
112. Patel, A. J., Honore, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M. (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nat. Neurosci* **2**, 422-426
113. Talley, E. M., Bayliss, D. A. (2002) Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem* **277**, 17733-17742
114. Liu, C., Au, J. D., Zou, H. L., Cotten, J. F., Yost, C. S. (2004) Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth. Analg* **99**, 1715-1722, table
115. Franks, N. P., Honore, E. (2004) The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 601-608
116. Lazarenko, R. M., Willcox, S. C., Shu, S., Berg, A. P., Jevtovic-Todorovic, V., Talley, E. M., Chen, X., Bayliss, D. A. (2010) Motoneuronal TASK channels contribute to immobilizing effects of inhalational general anesthetics. *J Neurosci* **30**, 7691-7704
117. Putzke, C., Hanley, P. J., Schlichthorl, G., Preisig-Muller, R., Rinne, S., Anetseder, M., Eckenhoff, R., Berkowitz, C., Vassiliou, T., Wulf, H., Eberhart, L. (2007) Differential effects of volatile and intravenous anesthetics on the activity of human TASK-1. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1319-1326
118. Harinath, S., Sikdar, S. K. (2004) Trichloroethanol enhances the activity of recombinant human TREK-1 and TRAAK channels. *Neuropharmacology* **46**, 750-760
119. Gruss, M., Bushell, T. J., Bright, D. P., Lieb, W. R., Mathie, A., Franks, N. P. (2004) Two-pore-domain K<sup>+</sup> channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol* **65**, 443-452
120. Jones, M. V., Brooks, P. A., Harrison, N. L. (1992) Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *J Physiol* **449**, 279-293
121. Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Muller, R., Grzeschik, K. H., Daut, J., Karschin, A., Derst, C. (2001) THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem* **276**, 7302-7311

122. Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., Lazdunski, M. (2004) TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* **23**, 2684-2695
123. Westphalen, R. I., Krivitski, M., Amarosa, A., Guy, N., Hemmings, H. C., Jr. (2007) Reduced inhibition of cortical glutamate and GABA release by halothane in mice lacking the K<sup>+</sup> channel, TREK-1. *Br J Pharmacol* **152**, 939-945
124. Linden, A. M., Aller, M. I., Leppa, E., Vekovischeva, O., Aitta-Aho, T., Veale, E. L., Mathie, A., Rosenberg, P., Wisden, W., Korpi, E. R. (2006) The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the alpha(2) adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **317**, 615-626
125. Linden, A. M., Sandu, C., Aller, M. I., Vekovischeva, O. Y., Rosenberg, P. H., Wisden, W., Korpi, E. R. (2007) TASK-3 knockout mice exhibit exaggerated nocturnal activity, impairments in cognitive functions, and reduced sensitivity to inhalation anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* **323**, 924-934
126. Pang, D. S., Robledo, C. J., Carr, D. R., Gent, T. C., Vyssotski, A. L., Caley, A., Zecharia, A. Y., Wisden, W., Brickley, S. G., Franks, N. P. (2009) An unexpected role for TASK-3 potassium channels in network oscillations with implications for sleep mechanisms and anesthetic action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17546-17551
127. Kindler, C. H., Yost, C. S. (2005) Two-pore domain potassium channels: new sites of local anesthetic action and toxicity. *Reg Anesth Pain Med* **30**, 260-274
128. Riegelhaupt, P. M., Tibbs, G. R., Goldstein, P. A. (2018) HCN and K2P Channels in Anesthetic Mechanisms Research. *Methods Enzymol* **602**, 391-416
129. Steinberg, E. A., Wafford, K. A., Brickley, S. G., Franks, N. P., Wisden, W. (2015) The role of K(2)p channels in anaesthesia and sleep. *Pflugers Arch* **467**, 907-916
130. Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thummler, S., Peng, X. D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., Gobbi, G., Vaugeois, J. M., Debonnel, G., Lazdunski, M. (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* **9**, 1134-1141
131. Liou, Y. J., Chen, T. J., Tsai, S. J., Yu, Y. W., Cheng, C. Y., Hong, C. J. (2009) Support for the involvement of the KCNK2 gene in major depressive disorder and response to antidepressant treatment. *Pharmacogenet Genomics* **19**, 735-741
132. Congiu, C., Minelli, A., Bonvicini, C., Bortolomasi, M., Sartori, R., Maj, C., Scassellati, C., Maina, G., Trabucchi, L., Segala, M., Gennarelli, M. (2015) The role of the potassium channel gene KCNK2 in major depressive disorder. *Psychiatry Res* **225**, 489-492
133. Kennard, L. E., Chumbley, J. R., Ranatunga, K. M., Armstrong, S. J., Veale, E. L., Mathie, A. (2005) Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol* **144**, 821-829
134. Thomas, D., Plant, L. D., Wilkens, C. M., McCrossan, Z. A., Goldstein, S. A. (2008) Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron* **58**, 859-870

135. Simkin, D., Cavanaugh, E. J., Kim, D. (2008) Control of the single channel conductance of K2P10.1 (TREK-2) by the amino-terminus: role of alternative translation initiation. *J. Physiol* **586**, 5651-5663
136. Eckert, M., Egenberger, B., Doring, F., Wischmeyer, E. (2011) TREK-1 isoforms generated by alternative translation initiation display different susceptibility to the antidepressant fluoxetine. *Neuropharmacology* **61**, 918-923
137. Mazella, J., Petrault, O., Lucas, G., Deval, E., Beraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., Taouji, S., Conductier, G., Corinus, A., Coppola, T., Gobbi, G., Nahon, J. L., Heurteaux, C., Borsotto, M. (2010) Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol* **8**, e1000355
138. Moha Ou, M. H., Veyssiere, J., Labbal, F., Coppola, T., Gandin, C., Widmann, C., Mazella, J., Heurteaux, C., Borsotto, M. (2012) Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology* **62**, 278-288
139. Djillani, A., Pietri, M., Mazella, J., Heurteaux, C., Borsotto, M. (2019) Fighting against depression with TREK-1 blockers: Past and future. A focus on spadin. *Pharmacol Ther* **194**, 185-198
140. Buttenschon, H. N., Demontis, D., Kaas, M., Elfving, B., Molgaard, S., Gustafsen, C., Kaerlev, L., Petersen, C. M., Borglum, A. D., Mors, O., Glerup, S. (2015) Increased serum levels of sortilin are associated with depression and correlated with BDNF and VEGF. *Transl Psychiatry* **5**, e677
141. Buttenschon, H. N., Nielsen, M., Glerup, S., Mors, O. (2018) Investigation of serum levels of sortilin in response to antidepressant treatment. *Acta Neuropsychiatr* **30**, 111-116
142. Devader, C., Roulot, M., Moreno, S., Minelli, A., Bortolomasi, M., Congiu, C., Gennarelli, M., Borsotto, M., Heurteaux, C., Mazella, J. (2017) Serum sortilin-derived propeptides concentrations are decreased in major depressive disorder patients. *J Affect Disord* **208**, 443-447
143. Roulot, M., Minelli, A., Bortolomasi, M., Maffioletti, E., Gennarelli, M., Borsotto, M., Heurteaux, C., Mazella, J. (2018) Increased serum levels of sortilin-derived propeptide after electroconvulsive therapy in treatment-resistant depressed patients. *Neuropsychiatr Dis Treat* **14**, 2307-2312
144. Mazella, J., Borsotto, M., Heurteaux, C. (2018) The Involvement of Sortilin/NTSR3 in Depression as the Progenitor of Spadin and Its Role in the Membrane Expression of TREK-1. *Front Pharmacol* **9**, 1541
145. Buckler, K. J., Williams, B. A., Honore, E. (2000) An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* **525 Pt 1**, 135-142
146. Williams, B. A., Buckler, K. J. (2004) Biophysical properties and metabolic regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type 1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L221-230
147. Varas, R., Buckler, K. J. (2006) Regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type I cells by ATP. *Adv Exp Med Biol* **580**, 167-172; discussion 351-169
148. Turner, P. J., Buckler, K. J. (2013) Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J. Physiol* **591**, 5977-5998

149. Kim, D., Cavanaugh, E. J., Kim, I., Carroll, J. L. (2009) Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K<sup>+</sup> channel in rat carotid body glomus cells. *J. Physiol* **587**, 2963-2975
150. Buckler, K. J. (2015) TASK channels in arterial chemoreceptors and their role in oxygen and acid sensing. *Pflugers Arch* **467**, 1013-1025
151. Varas, R., Wyatt, C. N., Buckler, K. J. (2007) Modulation of TASK-like background potassium channels in rat arterial chemoreceptor cells by intracellular ATP and other nucleotides. *J Physiol* **583**, 521-536
152. Conde, S. V., Monteiro, E. C. (2004) Hypoxia induces adenosine release from the rat carotid body. *J Neurochem* **89**, 1148-1156
153. Cotten, J. F., Keshavaprasad, B., Laster, M. J., Eger, E. I., 2nd, Yost, C. S. (2006) The ventilatory stimulant doxapram inhibits TASK tandem pore (K2P) potassium channel function but does not affect minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* **102**, 779-785
154. Cotten, J. F. (2013) TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) tandem pore potassium channel antagonists stimulate breathing in isoflurane-anesthetized rats. *Anesth. Analg* **116**, 810-816
155. O'Donohoe, P. B., Huskens, N., Turner, P. J., Pandit, J. J., Buckler, K. J. (2018) A1899, PK-THPP, ML365, and Doxapram inhibit endogenous TASK channels and excite calcium signaling in carotid body type-1 cells. *Physiol Rep* **6**, e13876
156. Cunningham, K. P., MacIntyre, D. E., Mathie, A., Veale, E. L. (2019) Effects of the ventilatory stimulant, doxapram on human TASK-3 (KCNK9, K2P9.1) channels and TASK-1 (KCNK3, K2P3.1) channels. *Acta Physiol (Oxf)*, e13361
157. Pandit, J. J., Buckler, K. J. (2009) Differential effects of halothane and sevoflurane on hypoxia-induced intracellular calcium transients of neonatal rat carotid body type I cells. *Br J Anaesth* **103**, 701-710
158. Pandit, J. J., Winter, V., Bayliss, R., Buckler, K. J. (2010) Differential effects of halothane and isoflurane on carotid body glomus cell intracellular Ca<sup>2+</sup> and background K<sup>+</sup> channel responses to hypoxia. *Adv Exp Med Biol* **669**, 205-208
159. Gestreau, C., Heitzmann, D., Thomas, J., Dubreuil, V., Bandulik, S., Reichold, M., Bendahhou, S., Pierson, P., Sterner, C., Peyronnet-Roux, J., Benfriha, C., Tegtmeier, I., Ehnes, H., Georgieff, M., Lesage, F., Brunet, J. F., Goridis, C., Warth, R., Barhanin, J. (2010) Task2 potassium channels set central respiratory CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2325-2330
160. Wang, S., Benamer, N., Zanella, S., Kumar, N. N., Shi, Y., Bevengut, M., Penton, D., Guyenet, P. G., Lesage, F., Gestreau, C., Barhanin, J., Bayliss, D. A. (2013) TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J. Neurosci* **33**, 16033-16044
161. Trapp, S., Aller, M. I., Wisden, W., Gourine, A. V. (2008) A role for TASK-1 (KCNK3) channels in the chemosensory control of breathing. *J Neurosci* **28**, 8844-8850
162. Mulkey, D. K., Talley, E. M., Stornetta, R. L., Siegel, A. R., West, G. H., Chen, X., Sen, N., Mistry, A. M., Guyenet, P. G., Bayliss, D. A. (2007) TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J Neurosci* **27**, 14049-14058
163. Kumar, N. N., Velic, A., Soliz, J., Shi, Y., Li, K., Wang, S., Weaver, J. L., Sen, J., Abbott, S. B., Lazarenko, R. M., Ludwig, M. G., Perez-Reyes, E., Mohebbi, N., Bettoni, C., Gassmann, M., Suply, T., Seuwen, K., Guyenet, P. G., Wagner,

- C. A., Bayliss, D. A. (2015) PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO<sub>2</sub> requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. *Science* **348**, 1255-1260
164. Bayliss, D. A., Barhanin, J., Gestreau, C., Guyenet, P. G. (2015) The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. *Pflügers Arch* **467**, 917-929
  165. Yuan, X. J., Wang, J., Juhaszova, M., Gaine, S. P., Rubin, L. J. (1998) Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* **351**, 726-727
  166. Remillard, C. V., Tigno, D. D., Platoshyn, O., Burg, E. D., Brevnova, E. E., Conger, D., Nicholson, A., Rana, B. K., Channick, R. N., Rubin, L. J., O'Connor D, T., Yuan, J. X. (2007) Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1837-1853
  167. Olschewski, A., Li, Y., Tang, B., Hanze, J., Eul, B., Bohle, R. M., Wilhelm, J., Morty, R. E., Brau, M. E., Weir, E. K., Kwapiszewska, G., Klepetko, W., Seeger, W., Olschewski, H. (2006) Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ. Res* **98**, 1072-1080
  168. Tang, B., Li, Y., Nagaraj, C., Morty, R. E., Gabor, S., Stacher, E., Voswinckel, R., Weissmann, N., Leithner, K., Olschewski, H., Olschewski, A. (2009) Endothelin-1 inhibits background two-pore domain channel TASK-1 in primary human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 476-483
  169. Manoury, B., Lamalle, C., Oliveira, R., Reid, J., Gurney, A. M. (2011) Contractile and electrophysiological properties of pulmonary artery smooth muscle are not altered in TASK-1 knockout mice. *J Physiol* **589**, 3231-3246
  170. Murtaza, G., Mermer, P., Goldenberg, A., Pfeil, U., Paddenber, R., Weissmann, N., Lochnit, G., Kummer, W. (2017) TASK-1 potassium channel is not critically involved in mediating hypoxic pulmonary vasoconstriction of murine intra-pulmonary arteries. *PLoS One* **12**, e0174071
  171. Kitagawa, M. G., Reynolds, J. O., Wehrens, X. H. T., Bryan, R. M., Jr., Pandit, L. M. (2017) Hemodynamic and Pathologic Characterization of the TASK-1(-/-) Mouse Does Not Demonstrate Pulmonary Hypertension. *Front Med (Lausanne)* **4**, 177
  172. Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R. P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W. P., Stewart, D. J. (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **328**, 1732-1739
  173. Seyler, C., Duthil-Straub, E., Zitron, E., Gierten, J., Scholz, E. P., Fink, R. H., Karle, C. A., Becker, R., Katus, H. A., Thomas, D. (2012) TASK1 (K(2P)3.1) K(+) channel inhibition by endothelin-1 is mediated through Rho kinase-dependent phosphorylation. *Br J Pharmacol* **165**, 1467-1475
  174. Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R. F., Olschewski, H., Robbins, I. M., Souza, R. (2013) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **62**, D34-41
  175. Ma, L., Roman-Campos, D., Austin, E. D., Eyries, M., Sampson, K. S., Soubrier, F., Germain, M., Tregouet, D. A., Borczuk, A., Rosenzweig, E. B.,

- Girerd, B., Montani, D., Humbert, M., Loyd, J. E., Kass, R. S., Chung, W. K. (2013) A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **369**, 351-361
176. Navas Tejedor, P., Tenorio Castano, J., Palomino Doza, J., Arias Lajara, P., Gordo Trujillo, G., Lopez Meseguer, M., Roman Broto, A., Lapunzina Abadia, P., Escribano Subia, P. (2017) An homozygous mutation in KCNK3 is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension. *Clin Genet* **91**, 453-457
  177. Antigny, F., Hautefort, A., Meloche, J., Belacel-Ouari, M., Manoury, B., Rucker-Martin, C., Pechoux, C., Potus, F., Nadeau, V., Tremblay, E., Ruffenach, G., Bourgeois, A., Dorfmueller, P., Breuils-Bonnet, S., Fadel, E., Ranchoux, B., Jourdon, P., Girerd, B., Montani, D., Provencher, S., Bonnet, S., Simonneau, G., Humbert, M., Perros, F. (2016) Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **133**, 1371-1385
  178. Cunningham, K. P., Holden, R. G., Escribano-Subias, P. M., Cogolludo, A., Veale, E. L., Mathie, A. (2019) Characterization and regulation of wild-type and mutant TASK-1 two pore domain potassium channels indicated in pulmonary arterial hypertension. *J Physiol* **597**, 1087-1101
  179. Olschewski, A., Veale, E. L., Nagy, B. M., Nagaraj, C., Kwapiszewska, G., Antigny, F., Lambert, M., Humbert, M., Cziráj, G., Enyedi, P., Mathie, A. (2017) TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: from cell biology to clinical implications. *Eur Respir J* **50**, 1700754
  180. Schmitt, N., Grunnet, M., Olesen, S. P. (2014) Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev* **94**, 609-653
  181. Schmidt, C., Wiedmann, F., Schweizer, P. A., Katus, H. A., Thomas, D. (2014) Inhibition of cardiac two-pore-domain K<sup>+</sup> (K2P) channels--an emerging antiarrhythmic concept. *Eur J Pharmacol* **738**, 250-255
  182. Wiedmann, F., Schmidt, C., Lugenbiel, P., Staudacher, I., Rahm, A. K., Seyler, C., Schweizer, P. A., Katus, H. A., Thomas, D. (2016) Therapeutic targeting of two-pore-domain potassium (K(2P)) channels in the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* **130**, 643-650
  183. Schmidt, C., Wiedmann, F., Voigt, N., Zhou, X. B., Heijman, J., Lang, S., Albert, V., Kallenberger, S., Ruhparwar, A., Szabo, G., Kallenbach, K., Karck, M., Borggreffe, M., Biliczki, P., Ehrlich, J. R., Baczko, I., Lugenbiel, P., Schweizer, P. A., Donner, B. C., Katus, H. A., Dobrev, D., Thomas, D. (2015) Upregulation of K(2P)3.1 K<sup>+</sup> Current Causes Action Potential Shortening in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation* **132**, 82-92
  184. Goldstein, S. A., Wang, K. W., Ilan, N., Pausch, M. H. (1998) Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J Mol Med (Berl)* **76**, 13-20
  185. Pountney, D. J., Gulkarov, I., Vega-Saenz de Miera, E., Holmes, D., Saganich, M., Rudy, B., Artman, M., Coetzee, W. A. (1999) Identification and cloning of TWIK-originated similarity sequence (TOSS): a novel human 2-pore K<sup>+</sup> channel principal subunit. *FEBS Lett* **450**, 191-196
  186. Rajan, S., Plant, L. D., Rabin, M. L., Butler, M. H., Goldstein, S. A. (2005) Sumoylation silences the plasma membrane leak K<sup>+</sup> channel K2P1. *Cell* **121**, 37-47

187. Ma, L., Xie, Y. P., Zhou, M., Chen, H. (2012) Silent TWIK-1 potassium channels conduct monovalent cation currents. *Biophys J* **102**, L34-36
188. Aryal, P., Abd-Wahab, F., Bucci, G., Sansom, M. S., Tucker, S. J. (2014) A hydrophobic barrier deep within the inner pore of the TWIK-1 K2P potassium channel. *Nat Commun* **5**, 4377
189. Christensen, A. H., Chatelain, F. C., Huttner, I. G., Olesen, M. S., Soka, M., Feliciangeli, S., Horvat, C., Santiago, C. F., Vandenberg, J. I., Schmitt, N., Olesen, S. P., Lesage, F., Fatkin, D. (2016) The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *J Mol Cell Cardiol* **97**, 24-35
190. Barth, A. S., Merk, S., Arnoldi, E., Zwermann, L., Kloos, P., Gebauer, M., Steinmeyer, K., Bleich, M., Kaab, S., Hinterseer, M., Kartmann, H., Kreuzer, E., Dugas, M., Steinbeck, G., Nabauer, M. (2005) Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res* **96**, 1022-1029
191. Wiedmann, F., Kiper, A. K., Bedoya, M., Ratte, A., Rinne, S., Kraft, M., Waibel, M., Anad, P., Wenzel, W., Gonzalez, W., Katus, H. A., Decher, N., Schmidt, C. (2019) Identification of the A293 (AVE1231) Binding Site in the Cardiac Two-Pore-Domain Potassium Channel TASK-1: a Common Low Affinity Antiarrhythmic Drug Binding Site. *Cell Physiol Biochem* **52**, 1223-1235
192. Donner, B. C., Schullenberg, M., Geduldig, N., Huning, A., Mersmann, J., Zacharowski, K., Kovacevic, A., Decking, U., Aller, M. I., Schmidt, K. G. (2011) Functional role of TASK-1 in the heart: studies in TASK-1-deficient mice show prolonged cardiac repolarization and reduced heart rate variability. *Basic Res Cardiol* **106**, 75-87
193. Decher, N., Wemhoner, K., Rinne, S., Netter, M. F., Zuzarte, M., Aller, M. I., Kaufmann, S. G., Li, X. T., Meuth, S. G., Daut, J., Sachse, F. B., Maier, S. K. (2011) Knock-out of the potassium channel TASK-1 leads to a prolonged QT interval and a disturbed QRS complex. *Cell Physiol Biochem* **28**, 77-86
194. Schmidt, C., Wiedmann, F., Langer, C., Tristram, F., Anand, P., Wenzel, W., Lugenbiel, P., Schweizer, P. A., Katus, H. A., Thomas, D. (2014) Cloning, functional characterization, and remodeling of K2P3.1 (TASK-1) potassium channels in a porcine model of atrial fibrillation and heart failure. *Heart Rhythm* **11**, 1798-1805
195. Harleton, E., Besana, A., Comas, G. M., Danilo, P., Jr., Rosen, T. S., Argenziano, M., Rosen, M. R., Robinson, R. B., Feinmark, S. J. (2013) Ability to induce atrial fibrillation in the peri-operative period is associated with phosphorylation-dependent inhibition of TWIK protein-related acid-sensitive potassium channel 1 (TASK-1). *J Biol Chem* **288**, 2829-2838
196. Harleton, E., Besana, A., Chandra, P., Danilo, P., Jr., Rosen, T. S., Rosen, M. R., Argenziano, M., Robinson, R. B., Feinmark, S. J. (2015) TASK-1 current is inhibited by phosphorylation during human and canine chronic atrial fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **308**, H126-134
197. Staudacher, K., Staudacher, I., Ficker, E., Seyler, C., Gierten, J., Kisselbach, J., Rahm, A. K., Trappe, K., Schweizer, P. A., Becker, R., Katus, H. A., Thomas, D. (2011) Carvedilol targets human K2P 3.1 (TASK1) K<sup>+</sup> leak channels. *Br J Pharmacol* **163**, 1099-1110

198. Gierten, J., Ficker, E., Bloehs, R., Schweizer, P. A., Zitron, E., Scholz, E., Karle, C., Katus, H. A., Thomas, D. (2010) The human cardiac K2P3.1 (TASK-1) potassium leak channel is a molecular target for the class III antiarrhythmic drug amiodarone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**, 261-270
199. Schmidt, C., Wiedmann, F., Schweizer, P. A., Becker, R., Katus, H. A., Thomas, D. (2013) Class I antiarrhythmic drugs inhibit human cardiac two-pore-domain K(+) (K2 (2)p) channels. *Eur J Pharmacol* **721**, 237-248
200. Czirják, G., Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., Enyedi, P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol* **14**, 863-874
201. 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
202. Czirják, G., Enyedi, P. (2002) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol* **16**, 621-629
203. 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
204. 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
205. Spät, A., Hunyady, L. (2004) Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* **84**, 489-539
206. Szabadkai, G., Várnai, P., Enyedi, P. (1999) Selective inhibition of potassium-stimulated rat adrenal glomerulosa cells by ruthenium red. *Biochem Pharmacol* **57**, 209-218
207. Enyeart, J. J., Xu, L., Danthi, S., Enyeart, J. A. (2002) An ACTH- and ATP-regulated background K<sup>+</sup> channel in adrenocortical cells is TREK-1. *J Biol Chem* **277**, 49186-49199
208. Enyeart, J. A., Danthi, S., Enyeart, J. J. (2003) Corticotropin induces the expression of TREK-1 mRNA and K<sup>+</sup> current in adrenocortical cells. *Mol Pharmacol* **64**, 132-142
209. Enyeart, J. A., Danthi, S. J., Enyeart, J. J. (2004) TREK-1 K<sup>+</sup> channels couple angiotensin II receptors to membrane depolarization and aldosterone secretion in bovine adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E1154-1165
210. Bandulik, S., Tauber, P., Lalli, E., Barhanin, J., Warth, R. (2015) Two-pore domain potassium channels in the adrenal cortex. *Pflugers Arch* **467**, 1027-1042
211. Gomez-Sanchez, C. E., Oki, K. (2014) Minireview: potassium channels and aldosterone dysregulation: is primary aldosteronism a potassium channelopathy? *Endocrinology* **155**, 47-55
212. Chen, A. X., Nishimoto, K., Nanba, K., Rainey, W. E. (2015) Potassium channels related to primary aldosteronism: Expression similarities and differences between human and rat adrenals. *Mol Cell Endocrinol* **417**, 141-148
213. Choi, M., Scholl, U. I., Yue, P., Bjorklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C. J., Lolis, E., Wisgerhof, M. V., Geller, D. S., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Akerstrom, G., Wang, W., Carling, T.,

- Lifton, R. P. (2011) K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* **331**, 768-772
214. Azizan, E. A., Murthy, M., Stowasser, M., Gordon, R., Kowalski, B., Xu, S., Brown, M. J., O'Shaughnessy, K. M. (2012) Somatic mutations affecting the selectivity filter of KCNJ5 are frequent in 2 large unselected collections of adrenal aldosteronomas. *Hypertension* **59**, 587-591
  215. Seidel, E., Schewe, J., Scholl, U. I. (2019) Genetic causes of primary aldosteronism. *Exp Mol Med* **51**, 131
  216. Decmann, A., Nyiro, G., Darvasi, O., Turai, P., Bancos, I., Kaur, R. J., Pezzani, R., Iacobone, M., Kraljevic, I., Kastelan, D., Parasiliti-Caprino, M., Maccario, M., Nirschl, N., Heinrich, D., Reincke, M., Patocs, A., Igaz, P. (2019) Circulating miRNA Expression Profiling in Primary Aldosteronism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 739
  217. Davies, L. A., Hu, C., Guagliardo, N. A., Sen, N., Chen, X., Talley, E. M., Carey, R. M., Bayliss, D. A., Barrett, P. Q. (2008) TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 2203-2208
  218. Guagliardo, N. A., Yao, J., Hu, C., Schertz, E. M., Tyson, D. A., Carey, R. M., Bayliss, D. A., Barrett, P. Q. (2012) TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension. *Hypertension* **59**, 999-1005
  219. Manichaikul, A., Rich, S. S., Allison, M. A., Guagliardo, N. A., Bayliss, D. A., Carey, R. M., Barrett, P. Q. (2016) KCNK3 Variants Are Associated With Hyperaldosteronism and Hypertension. *Hypertension* **68**, 356-364
  220. Guagliardo, N. A., Yao, J., Stipes, E. J., Cechova, S., Le, T. H., Bayliss, D. A., Breault, D. T., Barrett, P. Q. (2019) Adrenal Tissue-Specific Deletion of TASK Channels Causes Aldosterone-Driven Angiotensin II-Independent Hypertension. *Hypertension* **73**, 407-414
  221. Talley, E. M., Lei, Q., Sirois, J. E., Bayliss, D. A. (2000) TASK-1, a two-pore domain K<sup>+</sup> channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* **25**, 399-410
  222. Boyd, D. F., Millar, J. A., Watkins, C. S., Mathie, A. (2000) The role of Ca<sup>2+</sup> stores in the muscarinic inhibition of the K<sup>+</sup> current IK(SO) in neonatal rat cerebellar granule cells. *J Physiol* **529 Pt 2**, 321-331
  223. Millar, J. A., Barratt, L., Southan, A. P., Page, K. M., Fyffe, R. E. W., Robertson, B., Mathie, A. (2000) A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3614-3618
  224. Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P. J., Gierschik, P. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* **360**, 684-686
  225. Nakanishi, S., Catt, K. J., Balla, T. (1995) A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5317-5321
  226. Chen, X., Talley, E. M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W. E., Dong, B., Viana, F., Garrison, J. C., Bayliss, D. A. (2006) Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 3422-3427

227. Besana, A., Barbuti, A., Tateyama, M. A., Symes, A. J., Robinson, R. B., Feinmark, S. J. (2004) Activation of protein kinase C epsilon inhibits the two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem* **279**, 33154-33160
228. Barbuti, A., Ishii, S., Shimizu, T., Robinson, R. B., Feinmark, S. J. (2002) Block of the background K(+) channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H2024-2030
229. Schiekkel, J., Lindner, M., Hetzel, A., Wemhoner, K., Renigunta, V., Schlichthorl, G., Decher, N., Oliver, D., Daut, J. (2013) The inhibition of the potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle by endothelin-1 is mediated by phospholipase C. *Cardiovasc Res* **97**, 97-105
230. Wilke, B. U., Lindner, M., Greifenberg, L., Albus, A., Kronimus, Y., Bunemann, M., Leitner, M. G., Oliver, D. (2014) Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat Commun* **5**, 5540
231. Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., Lazdunski, M. (2003) Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K<sup>+</sup> channels. *EMBO J* **22**, 5403-5411
232. Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R., Oliver, D. (2011) Probing the regulation of TASK potassium channels by PI4,5P(2) with switchable phosphoinositide phosphatases. *J Physiol* **589**, 3149-3162
233. Kang, D., Han, J., Talley, E. M., Bayliss, D. A., Kim, D. (2004) Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol* **554**, 64-77
234. Blin, S., Chatelain, F. C., Feliciangeli, S., Kang, D., Lesage, F., Bichet, D. (2014) Tandem pore domain halothane-inhibited K<sup>+</sup> channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem* **289**, 28202-28212
235. 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
236. 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
237. Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E. J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., Bichet, D. (2016) Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K2P channels with unique properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 4200-4205
238. Levitz, J., Royal, P., Comoglio, Y., Wdziekonski, B., Schaub, S., Clemens, D. M., Isacoff, E. Y., Sandoz, G. (2016) Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 4194-4199
239. Lauritzen, I., Zanzouri, M., Honore, E., Duprat, F., Ehrenguber, M. U., Lazdunski, M., Patel, A. J. (2003) K<sup>+</sup>-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem* **278**, 32068-32076
240. Aller, M. I., Veale, E. L., Linden, A. M., Sandu, C., Schwaninger, M., Evans, L. J., Korpi, E. R., Mathie, A., Wisden, W., Brickley, S. G. (2005) Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci* **25**, 11455-11467

241. Berg, A. P., Talley, E. M., Manger, J. P., Bayliss, D. A. (2004) Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J. Neurosci* **24**, 6693-6702
242. Larkman, P. M., Perkins, E. M. (2005) A TASK-like pH- and amine-sensitive 'leak' K<sup>+</sup> conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro. *Eur. J. Neurosci* **21**, 679-691
243. Musset, B., Meuth, S. G., Liu, G. X., Derst, C., Wegner, S., Pape, H. C., Budde, T., Preisig-Muller, R., Daut, J. (2006) Effects of divalent cations and spermine on the K<sup>+</sup> channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J. Physiol* **572**, 639-657
244. Putzke, C., Wemhoner, K., Sachse, F. B., Rinne, S., Schlichthorl, G., Li, X. T., Jae, L., Eckhardt, I., Wischmeyer, E., Wulf, H., Preisig-Muller, R., Daut, J., Decher, N. (2007) The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc. Res* **75**, 59-68
245. Berg, A. P., Bayliss, D. A. (2007) Striatal cholinergic interneurons express a receptor-insensitive homomeric TASK-3-like background K<sup>+</sup> current. *J. Neurophysiol* **97**, 1546-1552
246. Deng, P. Y., Lei, S. (2008) Serotonin increases GABA release in rat entorhinal cortex by inhibiting interneuron TASK-3 K<sup>+</sup> channels. *Mol. Cell Neurosci* **39**, 273-284
247. Weber, M., Schmitt, A., Wischmeyer, E., Doring, F. (2008) Excitability of pontine startle processing neurones is regulated by the two-pore-domain K<sup>+</sup> channel TASK-3 coupled to 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Eur. J. Neurosci* **28**, 931-940
248. Ernest, N. J., Logsdon, N. J., McFerrin, M. B., Sontheimer, H., Spiller, S. E. (2010) Biophysical properties of human medulloblastoma cells. *J. Membr. Biol* **237**, 59-69
249. Cadaveira-Mosquera, A., Ribeiro, S. J., Reboreda, A., Perez, M., Lamas, J. A. (2011) Activation of TREK currents by the neuroprotective agent riluzole in mouse sympathetic neurons. *J. Neurosci* **31**, 1375-1385
250. Hur, C. G., Kim, E. J., Cho, S. K., Cho, Y. W., Yoon, S. Y., Tak, H. M., Kim, C. W., Choe, C., Han, J., Kang, D. (2012) K(+) efflux through two-pore domain K(+) channels is required for mouse embryonic development. *Reproduction* **143**, 625-636
251. Andronic, J., Bobak, N., Bittner, S., Ehling, P., Kleinschnitz, C., Herrmann, A. M., Zimmermann, H., Sauer, M., Wiendl, H., Budde, T., Meuth, S. G., Sukhorukov, V. L. (2013) Identification of two-pore domain potassium channels as potent modulators of osmotic volume regulation in human T lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 699-707
252. Leithner, K., Hirschmugl, B., Li, Y., Tang, B., Papp, R., Nagaraj, C., Stacher, E., Stiegler, P., Lindenmann, J., Olschewski, A., Olschewski, H., Hrzenjak, A. (2016) TASK-1 Regulates Apoptosis and Proliferation in a Subset of Non-Small Cell Lung Cancers. *PLoS One* **11**, e0157453
253. Sauter, D. R., Sorensen, C. E., Rapedius, M., Bruggemann, A., Novak, I. (2016) pH-sensitive K(+) channel TREK-1 is a novel target in pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* **1862**, 1994-2003
254. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph* **14**, 33-38

255. Czirják, G. (2015) PrinCCes: Continuity-based geometric decomposition and systematic visualization of the void repertoire of proteins. *J Mol Graph Model* **62**, 118-127
256. Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., Wischmeyer, E., Doring, F. (2007) TRESK two-pore-domain K<sup>+</sup> channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol* **585**, 867-879
257. Chae, Y. J., Zhang, J., Au, P., Sabbadini, M., Xie, G. X., Yost, C. S. (2010) Discrete change in volatile anesthetic sensitivity in mice with inactivated tandem pore potassium ion channel TRESK. *Anesthesiology* **113**, 1326-1337
258. Andres-Enguix, I., Shang, L., Stansfeld, P. J., Morahan, J. M., Sansom, M. S., Lafreniere, R. G., Roy, B., Griffiths, L. R., Rouleau, G. A., Ebers, G. C., Cader, Z. M., Tucker, S. J. (2012) Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K<sup>+</sup> channel. *Sci. Rep* **2**, 237
259. Castellanos, A., Pujol-Coma, A., Andres-Bilbe, A., Negm, A., Callejo, G., Soto, D., Noel, J., Comes, N., Gasull, X. (2020) TRESK background K(+) channel deletion selectively uncovers enhanced mechanical and cold sensitivity. *J Physiol*
260. Pettingill, P., Weir, G. A., Wei, T., Wu, Y., Flower, G., Lalic, T., Handel, A., Duggal, G., Chintawar, S., Cheung, J., Arunasalam, K., Couper, E., Haupt, L. M., Griffiths, L. R., Bassett, A., Cowley, S. A., Cader, M. Z. (2019) A causal role for TRESK loss of function in migraine mechanisms. *Brain* **142**, 3852-3867
261. Ottschytch, N., Raes, A., Van Hoorick, D., Snyders, D. J. (2002) Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7986-7991
262. Czirják, G., Tóth, Z. E., Enyedi, P. (2007) Characterization of the heteromeric potassium channel formed by kv2.1 and the retinal subunit kv8.2 in *Xenopus* oocytes. *J Neurophysiol* **98**, 1213-1222
263. Beech, D. J., Barnes, S. (1989) Characterization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel that accelerates the rod response to dim light. *Neuron* **3**, 573-581
264. Wollmuth, L. P. (1994) Mechanism of Ba<sup>2+</sup> block of M-like K channels of rod photoreceptors of tiger salamanders. *J Gen Physiol* **103**, 45-66
265. Wu, H., Cowing, J. A., Michaelides, M., Wilkie, S. E., Jeffery, G., Jenkins, S. A., Mester, V., Bird, A. C., Robson, A. G., Holder, G. E., Moore, A. T., Hunt, D. M., Webster, A. R. (2006) Mutations in the gene KCNV2 encoding a voltage-gated potassium channel subunit cause "cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram" in humans. *Am J Hum Genet* **79**, 574-579
266. Smith, K. E., Wilkie, S. E., Tebbs-Warner, J. T., Jarvis, B. J., Gallasch, L., Stocker, M., Hunt, D. M. (2012) Functional analysis of missense mutations in Kv8.2 causing cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram. *J Biol Chem* **287**, 43972-43983
267. Gayet-Primo, J., Yaeger, D. B., Khanjian, R. A., Puthussery, T. (2018) Heteromeric KV2/KV8.2 Channels Mediate Delayed Rectifier Potassium Currents in Primate Photoreceptors. *J Neurosci* **38**, 3414-3427
268. Yoshida, S., Plant, S. (1992) Mechanism of release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in response to ionomycin in oocytes of the frog *Xenopus laevis*. *J Physiol* **458**, 307-318

269. Thurman, C. L., Burns, J. S., O'Neil, R. G. (2000) Identifying the Ca(++) signalling sources activating chloride currents in *Xenopus* oocytes using ionomycin and thapsigargin. *Cell Signal* **12**, 629-635
270. Crabtree, G. R., Olson, E. N. (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-79
271. Li, H., Rao, A., Hogan, P. G. (2004) Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *J. Mol. Biol* **342**, 1659-1674
272. Aramburu, J., Yaffe, M. B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L. C., Hogan, P. G., Rao, A. (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* **285**, 2129-2133
273. Roy, J., Cyert, M. S. (2009) Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal* **2**, re9
274. Li, H., Rao, A., Hogan, P. G. (2011) Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* **21**, 91-103
275. Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A., Hogan, P. G. (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* **1**, 627-637
276. Garcia-Cozar, F. J., Okamura, H., Aramburu, J. F., Shaw, K. T., Pelletier, L., Showalter, R., Villafranca, E., Rao, A. (1998) Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. *J Biol Chem* **273**, 23877-23883
277. Liu, J., Masuda, E. S., Tsuruta, L., Arai, N., Arai, K. (1999) Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. *J Immunol* **162**, 4755-4761
278. Park, S., Uesugi, M., Verdine, G. L. (2000) A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7130-7135
279. Liu, J., Arai, K., Arai, N. (2001) Inhibition of NFATx activation by an oligopeptide: disrupting the interaction of NFATx with calcineurin. *J Immunol* **167**, 2677-2687
280. Sheftic, S. R., Page, R., Peti, W. (2016) Investigating the human Calcineurin Interaction Network using the piLxVP SLiM. *Sci Rep* **6**, 38920
281. Martinez-Martinez, S., Rodriguez, A., Lopez-Maderuelo, M. D., Ortega-Perez, I., Vazquez, J., Redondo, J. M. (2006) Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* **281**, 6227-6235
282. Sola, C., Tusell, J. M., Serratos, J. (1999) Comparative study of the distribution of calmodulin kinase II and calcineurin in the mouse brain. *J Neurosci Res* **57**, 651-662
283. Mehta, S., Li, H., Hogan, P. G., Cunningham, K. W. (2009) Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Mol Cell Biol* **29**, 2777-2793
284. Rodriguez, A., Roy, J., Martinez-Martinez, S., Lopez-Maderuelo, M. D., Nino-Moreno, P., Orti, L., Pantoja-Uceda, D., Pineda-Lucena, A., Cyert, M. S., Redondo, J. M. (2009) A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol Cell* **33**, 616-626
285. Li, H., Zhang, L., Rao, A., Harrison, S. C., Hogan, P. G. (2007) Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *J. Mol. Biol* **369**, 1296-1306

286. Villasante, A., Wang, D., Dobner, P., Dolph, P., Lewis, S. A., Cowan, N. J. (1986) Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. *Mol. Cell Biol* **6**, 2409-2419
287. Gendreau, S., Schirmer, J., Schmalzing, G. (2003) Identification of a tubulin binding motif on the P2X2 receptor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **786**, 311-318
288. Enyedi, P., Braun, G., Czirják, G. (2012) TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol. Cell Endocrinol* **353**, 75-81
289. Fu, H., Subramanian, R. R., Masters, S. C. (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 617-647
290. Aitken, A. (2006) 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**, 162-172
291. Morrison, D. K. (2009) The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* **19**, 16-23
292. Pennington, K. L., Chan, T. Y., Torres, M. P., Andersen, J. L. (2018) The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene* **37**, 5587-5604
293. Cau, Y., Valensin, D., Mori, M., Draghi, S., Botta, M. (2018) Structure, Function, Involvement in Diseases and Targeting of 14-3-3 Proteins: An Update. *Curr Med Chem* **25**, 5-21
294. Zhang, L., Wang, H., Liu, D., Liddington, R., Fu, H. (1997) Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3zeta through a common site involving lysine 49. *J Biol Chem* **272**, 13717-13724
295. Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A., Muslin, A. J. (2000) 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J* **19**, 349-358
296. Hausser, A., Link, G., Hoene, M., Russo, C., Selchow, O., Pfizenmaier, K. (2006) Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity. *J Cell Sci* **119**, 3613-3621
297. Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., Shaw, A. S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-897
298. Thorson, J. A., Yu, L. W., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnicka-Worms, H., Shaw, A. S. (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol. Cell Biol* **18**, 5229-5238
299. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934
300. Sugiyama, N., Imamura, H., Ishihama, Y. (2019) Large-scale Discovery of Substrates of the Human Kinome. *Sci Rep* **9**, 10503
301. Matenia, D., Mandelkow, E. M. (2009) The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci* **34**, 332-342
302. Rahm, A. K., Gierten, J., Kisselbach, J., Staudacher, I., Staudacher, K., Schweizer, P. A., Becker, R., Katus, H. A., Thomas, D. (2012) PKC-dependent activation of human K2P18.1 K<sup>+</sup> channels. *Br. J. Pharmacol* **166**, 764-773

303. 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
304. Watkins, J. L., Lewandowski, K. T., Meek, S. E., Storz, P., Toker, A., Piwnicka-Worms, H. (2008) Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 18378-18383
305. Uberall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H. H., Baier, G. (1997) Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **272**, 4072-4078
306. Czirják, G., Enyedi, P. (2006) Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K<sup>+</sup> channels. *Mol. Pharmacol* **69**, 1024-1032
307. Rahm, A. K., Wiedmann, F., Gierten, J., Schmidt, C., Schweizer, P. A., Becker, R., Katus, H. A., Thomas, D. (2013) Functional characterization of zebrafish K2P18.1 (TRESK) two-pore-domain K<sup>+</sup> channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* **387**, 291-300
308. Keshavaprasad, B., Liu, C., Au, J. D., Kindler, C. H., Cotten, J. F., Yost, C. S. (2005) Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. *Anesth. Analg* **101**, 1042-1049
309. Cadaveira-Mosquera, A., Perez, M., Reboreda, A., Rivas-Ramirez, P., Fernandez-Fernandez, D., Lamas, J. A. (2012) Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system. *J. Mol. Neurosci* **48**, 86-96
310. Hughes, S., Foster, R. G., Peirson, S. N., Hankins, M. W. (2017) Expression and localisation of two-pore domain (K2P) background leak potassium ion channels in the mouse retina. *Sci Rep* **7**, 46085
311. Kollert, S., Dombert, B., Doring, F., Wischmeyer, E. (2015) Activation of TRESK channels by the inflammatory mediator lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling. *Sci Rep* **5**, 12548
312. Kanda, H., Ling, J., Tonomura, S., Noguchi, K., Matalon, S., Gu, J. G. (2019) TREK-1 and TRAAK Are Principal K(+) Channels at the Nodes of Ranvier for Rapid Action Potential Conduction on Mammalian Myelinated Afferent Nerves. *Neuron* **104**, 960-971 e967
313. Du, X., Hao, H., Gigout, S., Huang, D., Yang, Y., Li, L., Wang, C., Sundt, D., Jaffe, D. B., Zhang, H., Gamper, N. (2014) Control of somatic membrane potential in nociceptive neurons and its implications for peripheral nociceptive transmission. *Pain* **155**, 2306-2322
314. Callejo, G., Giblin, J. P., Gasull, X. (2013) Modulation of TRESK background K<sup>+</sup> channel by membrane stretch. *PLoS. One* **8**, e64471
315. Kang, D., Kim, G. T., Kim, E. J., La, J. H., Lee, J. S., Lee, E. S., Park, J. Y., Hong, S. G., Han, J. (2008) Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **367**, 609-615
316. Liu, P., Xiao, Z., Ren, F., Guo, Z., Chen, Z., Zhao, H., Cao, Y. Q. (2013) Functional analysis of a migraine-associated TRESK K<sup>+</sup> channel mutation. *J. Neurosci* **33**, 12810-12824
317. Guo, Z., Cao, Y. Q. (2014) Over-Expression of TRESK K<sup>+</sup> Channels Reduces the Excitability of Trigeminal Ganglion Nociceptors. *PLoS. One* **9**, e87029

318. Bautista, D. M., Sigal, Y. M., Milstein, A. D., Garrison, J. L., Zorn, J. A., Tsuruda, P. R., Nicoll, R. A., Julius, D. (2008) Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci* **11**, 772-779
319. Gerhold, K. A., Bautista, D. M. (2009) Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1170**, 184-189
320. Lennertz, R. C., Tsunozaki, M., Bautista, D. M., Stucky, C. L. (2010) Physiological basis of tingling paresthesia evoked by hydroxy-alpha-sanshool. *J. Neurosci* **30**, 4353-4361
321. Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., Gasull, X. (2011) TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol. Pain* **7**, 30
322. Castellanos, A., Andres, A., Bernal, L., Callejo, G., Comes, N., Gual, A., Giblin, J. P., Roza, C., Gasull, X. (2018) Pyrethroids inhibit K2P channels and activate sensory neurons: basis of insecticide-induced paraesthesias. *Pain* **159**, 92-105
323. Wright, P. D., Weir, G., Cartland, J., Tickle, D., Kettleborough, C., Cader, M. Z., Jerman, J. (2013) Cloxyquin (5-chloroquinolin-8-ol) is an activator of the two-pore domain potassium channel TRESK. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **441**, 463-468
324. Lengyel, M., Dobolyi, A., Czirják, G., Enyedi, P. (2017) Selective and state-dependent activation of TRESK (K2P 18.1) background potassium channel by cloxyquin. *Br J Pharmacol* **174**, 2102-2113
325. Lengyel, M., Erdélyi, F., Pergel, E., Balint-Polonka, A., Dobolyi, A., Bozsaki, P., Dux, M., Király, K., Hegedűs, T., Czirják, G., Mátyus, P., Enyedi, P. (2019) Chemically Modified Derivatives of the Activator Compound Cloxyquin Exert Inhibitory Effect on TRESK (K2P18.1) Background Potassium Channel. *Mol Pharmacol* **95**, 652-660
326. Zhou, J., Yang, C. X., Zhong, J. Y., Wang, H. B. (2013) Intrathecal TRESK gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Neuroreport* **24**, 131-136
327. Li, Y., Jiao, H., Ren, W., Ren, F. (2019) TRESK alleviates trigeminal neuralgia induced by infraorbital nerve chronic constriction injury in rats. *Mol Pain* **15**, 1744806919882511
328. Macian, F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**, 472-484
329. Dougherty, M. K., Ritt, D. A., Zhou, M., Specht, S. I., Monson, D. M., Veenstra, T. D., Morrison, D. K. (2009) KSR2 is a calcineurin substrate that promotes ERK cascade activation in response to calcium signals. *Mol Cell* **34**, 652-662
330. Slupe, A. M., Merrill, R. A., Flippo, K. H., Lobas, M. A., Houtman, J. C., Strack, S. (2013) A calcineurin docking motif (LXVP) in dynamin-related protein 1 contributes to mitochondrial fragmentation and ischemic neuronal injury. *J Biol Chem* **288**, 12353-12365
331. Grigoriu, S., Bond, R., Cossio, P., Chen, J. A., Ly, N., Hummer, G., Page, R., Cyert, M. S., Peti, W. (2013) The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS Biol* **11**, e1001492
332. Mathie, A., Veale, E. L. (2015) Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflugers Arch* **467**, 931-943

333. Gada, K., Plant, L. D. (2018) K2P channels: Emerging targets for novel analgesic drugs. *Br J Pharmacol* **176**, 256-266
334. Li, X. Y., Toyoda, H. (2015) Role of leak potassium channels in pain signaling. *Brain Res Bull* **119**, 73-79
335. Tsantoulas, C. (2015) Emerging potassium channel targets for the treatment of pain. *Curr Opin Support Palliat Care* **9**, 147-154
336. Vivier, D., Bennis, K., Lesage, F., Ducki, S. (2016) Perspectives on the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 (TWIK-Related K(+) Channel 1). A Novel Therapeutic Target? *J Med Chem* **59**, 5149-5157
337. Salzer, I., Ray, S., Schicker, K., Boehm, S. (2019) Nociceptor Signalling through ion Channel Regulation via GPCRs. *Int J Mol Sci* **20**, E2488
338. Busserolles, J., Tsantoulas, C., Eschalier, A., Lopez Garcia, J. A. (2016) Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. *Pain* **157 Suppl 1**, S7-14
339. Djillani, A., Mazella, J., Heurteaux, C., Borsotto, M. (2019) Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front Pharmacol* **10**, 379
340. Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L., Lawson, S. N. (2012) Leak K(+) channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Mol. Cell Neurosci* **49**, 375-386
341. Acosta, C., Djouhri, L., Watkins, R., Berry, C., Bromage, K., Lawson, S. N. (2014) TREK2 expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous pain. *J. Neurosci* **34**, 1494-1509
342. Dadi, P. K., Vierra, N. C., Days, E., Dickerson, M. T., Vinson, P. N., Weaver, C. D., Jacobson, D. A. (2017) Selective Small Molecule Activators of TREK-2 Channels Stimulate Dorsal Root Ganglion c-Fiber Nociceptor Two-Pore-Domain Potassium Channel Currents and Limit Calcium Influx. *ACS Chem Neurosci* **8**, 558-568
343. Viatchenko-Karpinski, V., Ling, J., Gu, J. G. (2018) Characterization of temperature-sensitive leak K(+) currents and expression of TRAAK, TREK-1, and TREK2 channels in dorsal root ganglion neurons of rats. *Mol Brain* **11**, 40
344. Guo, Z., Liu, P., Ren, F., Cao, Y. Q. (2014) Nonmigraine-associated TRESK K+ channel variant C110R does not increase the excitability of trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol* **112**, 568-579
345. Zhou, J., Yao, S. L., Yang, C. X., Zhong, J. Y., Wang, H. B., Zhang, Y. (2012) TRESK gene recombinant adenovirus vector inhibits capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Mol. Med. Rep* **5**, 1049-1052
346. Pollema-Mays, S. L., Centeno, M. V., Ashford, C. J., Apkarian, A. V., Martina, M. (2013) Expression of background potassium channels in rat DRG is cell-specific and down-regulated in a neuropathic pain model. *Mol. Cell Neurosci* **57**, 1-9
347. Yang, Y., Li, S., Jin, Z. R., Jing, H. B., Zhao, H. Y., Liu, B. H., Liang, Y. J., Liu, L. Y., Cai, J., Wan, Y., Xing, G. G. (2018) Decreased abundance of TRESK two-pore domain potassium channels in sensory neurons underlies the pain associated with bone metastasis. *Sci Signal* **11**

348. Grabauskas, G., Wu, X., Song, I., Zhou, S. Y., Lanigan, T., Owyang, C. (2016) Increased Activation of the TRESK K(+) Mediates Vago-Vagal Reflex Malfunction in Diabetic Rats. *Gastroenterology* **151**, 910-922 e917
349. Grabauskas, G., Wu, X., Zhou, S., Li, J., Gao, J., Owyang, C. (2019) High-fat diet-induced vagal afferent dysfunction via upregulation of 2-pore domain potassium TRESK channel. *JCI Insight* **4**
350. Huang, D. Y., Yu, B. W., Fan, Q. W. (2008) Roles of TRESK, a novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, in pain pathway and general anesthesia. *Neurosci. Bull* **24**, 166-172
351. Smith, H. S. (2009) Calcineurin as a nociceptor modulator. *Pain Physician* **12**, E309-E318
352. Hucho, T., Levine, J. D. (2007) Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* **55**, 365-376
353. Taiwo, Y. O., Bjerknes, L. K., Goetzl, E. J., Levine, J. D. (1989) Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* **32**, 577-580
354. Lopshire, J. C., Nicol, G. D. (1998) The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci* **18**, 6081-6092
355. Bhawe, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., Oxford, G. S., Gereau, R. W. t. (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* **35**, 721-731
356. Gold, M. S., Levine, J. D., Correa, A. M. (1998) Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci* **18**, 10345-10355
357. Khasar, S. G., Lin, Y. H., Martin, A., Dadgar, J., McMahon, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K. O., Isenberg, W., McCarter, G., Green, P. G., Hodge, C. W., Levine, J. D., Messing, R. O. (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* **24**, 253-260
358. Aley, K. O., Messing, R. O., Mochly-Rosen, D., Levine, J. D. (2000) Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci* **20**, 4680-4685
359. Dina, O. A., Chen, X., Reichling, D., Levine, J. D. (2001) Role of protein kinase C epsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* **108**, 507-515
360. Pan, H. L., Zhang, Y. Q., Zhao, Z. Q. (2010) Involvement of lysophosphatidic acid in bone cancer pain by potentiation of TRPV1 via PKCepsilon pathway in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* **6**, 85
361. Honda, K., Shinoda, M., Kondo, M., Shimizu, K., Yonemoto, H., Otsuki, K., Akasaka, R., Furukawa, A., Iwata, K. (2017) Sensitization of TRPV1 and TRPA1 via peripheral mGluR5 signaling contributes to thermal and mechanical hypersensitivity. *Pain* **158**, 1754-1764
362. Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M. (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C epsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* **277**, 13375-13378
363. Kandasamy, R., Price, T. J. (2015) The pharmacology of nociceptor priming. *Handb Exp Pharmacol* **227**, 15-37

364. Parada, C. A., Yeh, J. J., Reichling, D. B., Levine, J. D. (2003) Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience* **120**, 219-226
365. Reichling, D. B., Levine, J. D. (2009) Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci* **32**, 611-618
366. Zhou, Y., Li, G. D., Zhao, Z. Q. (2003) State-dependent phosphorylation of epsilon-isozyme of protein kinase C in adult rat dorsal root ganglia after inflammation and nerve injury. *J Neurochem* **85**, 571-580

## 11. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 Kv2.1 and the retinal subunit Kv8.2 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.**<sup>#</sup>, 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.<sup>#</sup>, 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.<sup>\*</sup>, 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.<sup>\*</sup>, Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., Enyedi, P. (2000)** TASK (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> 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**

Az összes közlemény tudományometriai adatai:

Közlemények száma: **32**

Első szerzős közlemények: **14**

Utolsó szerzős közlemények: **7**

Egyedüli szerzős közlemény: **1**

Társszerzős közlemény: **10**

Levelező szerzős közlemény: **7**

Kumulatív IF: **163.8**

Összes idézettség: **1656**

Független idézettség: **1481**