

A TREK és a TRESK csatornák a primer szomatoszenzoros idegsejtek fő háttér káliumcsatornáit
Doktori értekezés

Dr. Lengyel Miklós

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Enyedi Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Varga Zoltán, az MTA doktora, egyetemi docens
Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szöllősi András Ph.D.,
tudományos főmunkatárs
Dr. Világi Ildikó Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
2.1. A két pórusdoménnel rendelkező (K_{2P}) háttér káliumcsatornák általános tulajdonságai	9
2.1.1. Felfedezés, nevezéktan	9
2.1.2. Alapvető szerkezeti tulajdonságok. Az extracelluláris sapkadomén	10
2.1.3. Elektrofiziológia	13
2.2. A TREK alcsalád K⁺-csatornáinak általános jellemzése	14
2.2.1. Biofizikai sajátosságok	14
2.2.2. Előfordulásuk a szervezetben	16
2.2.3. Szabályozásuk	17
2.2.4. Farmakológiai tulajdonságok	20
2.2.5. Élettani, kórélettani jelentőségük	21
2.3. A TRESK háttér K⁺-csatorna általános jellemzése	25
2.3.1. Felfedezése, különleges egyedi csatorna jellemzők	25
2.3.2. Kifejeződése a szervezetben	26
2.3.3. Egyedülálló kalciumfüggő szabályozás	27
2.3.4. Farmakológiai tulajdonságok	29
2.3.5. Élettani, kórélettani jelentőség	32
2.4. K_{2P} csatorna alegységek heterodimerizációja, ennek jelentősége	35
2.4.1. A TASK-1 és TASK-3 funkcionális heterodimert képeznek	36
2.4.2. A TWIK-1 alegység többféle alegységgel állhat össze	36
2.4.3. A THIK-1 és THIK-2 heterodimert képeznek	38
3. Célkitűzések	39
4. Módszerek	40
4.1. Felhasznált anyagok	40
4.2. Molekuláris biológia	40
4.3. Petesejtek preparálása, injektálása	42
4.4. Emlős sejtvonalak tenyésztése, tranziens transzfekció	43
4.5. Egér hátsó gyöki ganlion preparálás, izolált idegsejttenyésztés létrehozása	44

4.6. Két-elektrodos voltage clamp mérések	44
4.7. Teljes-sejt (whole cell) patch clamp mérések	46
4.8. Kitépelt foltos (excised patch) patch clamp mérések	47
4.9. Membránfrakció preparálás <i>Xenopus</i> petesejtekből, Western blot kísérletek	50
4.10. Statisztikai elemzés	52
5. Eredmények	53
5.1. TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimerizációjának vizsgálata	53
5.1.1. A TREK-1/TREK-2 heterodimer tandem konstrukcióval modellezhető	53
5.1.2. A tandem konstrukció elkülöníthető a homodimerektől	54
5.1.3. A TREK-1 és TREK-2 heterodimert képeznek heterológ rendszerekben	56
5.1.4. A TREK-1/TREK-2 heterodimer farmakológiailag elkülöníthető az egyedi csatornák szintjén a homodimerektől	65
5.1.5. A TREK-1/TREK-2 heterodimer kimutatható DRG neuronokban	71
5.2. A cloxyquin hatása a TRESK csatornára	73
5.2.1. A cloxyquin az egér TRESK csatorna szelektív aktivátora	73
5.2.2. A cloxyquin hatása a kalciumtól és calcineurintól független	75
5.2.3. A cloxyquin a humán TRESK csatornát is aktiválja	79
5.2.4. Az egér TRESK F156,364A mutáns csatorna konstitutívan aktív	81
5.2.5. A cloxyquin aktiválja a DRG idegsejtek háttér káliumáramát	82
5.3. Cloxyquin származékok hatása a TRESK csatornára	85
5.3.1. Az A2793 az egér TRESK állapotfüggő gátlószere	85
5.3.2. Az A2764 az egér TRESK áram szelektív, állapotfüggő gátlószere	87
5.3.3. Az A2764 DRG idegsejtekben gátolja a TRESK áramot	89
5.3.4. Az A2764 fokozza a DRG idegsejtek ingerlékenységét	90
6. Megbeszélés	95
6.1. A különböző TREK alegységek működőképes heterodimereket képeznek	95
6.2. A cloxyquin a TRESK csatorna szelektív aktivátora	98
6.3. Cloxyquin származékok hatása a TRESK csatornára	99

7. Következtetések	102
8. Összefoglalás	103
9. Summary	104
10.Irodalomjegyzék	105
11.Saját publikációk jegyzéke	125
12.Köszönetnyilvánítás	127

1. Rövidítések jegyzéke

4-AP 4-aminopiridin

AKAP150 150 kilodaltonos protein kináz A-t horgonyzó fehérje (A-kinase-anchoring protein 150)

ANOVA varianciaanalízis (analysis of variance)

cRNS komplementer ribonukleinsav („complementary RNA”)

DMEM Dulbecco-féle módosított Eagle-féle médium (Dulbecco’s modified Eagle’s medium)

DRG hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion)

EC extracelluláris

EC₅₀ fél-maximális hatékony koncentráció (half-maximal effective concentration)

EIP extracelluláris ionút (extracellular ion pathway)

FBS főtális szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)

HEK293T humán embrionális vesesejtvonal, 293T típus (Human Embryonic Kidney 293T cell line)

HEPES 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav

IC intracelluláris

IC₅₀ fél-maximális gátló koncentráció (half-maximal inhibitory concentration)

K_{2P} két pórusdoménnal rendelkező K⁺ csatorna (two-pore domain K⁺ channel)

K_{Ca} Ca²⁺-függő K⁺ csatorna (calcium dependent K⁺ channel)

K_{ir} Befelé rektifikáló K⁺ csatorna (inwardly-rectifying K⁺ channel)

K_v Feszültségfüggő K⁺ csatorna (voltage-gated K⁺ channel)

KO Génkiütött egértörzs (Knockout, „KO” törzs)

MARK Mikrotubulus affinitást reguláló kináz (microtubule-associated-protein/microtubule affinity-regulating kinase)

MEM módosított Eagle-féle médium („modified Eagle’s medium)

NFAT aktivált T sejtek nukleáris faktora (nuclear factor of activated T-cells)

NP_o Csatornaaktivitás (N: csatornák száma)

P pórusdomén

PAGE poliakrilamid gélelektroforézis

PBS foszfát pufferelt sóoldat („phosphate buffered saline”)

PIP₂ foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
P_o nyitvatartási valószínűség (open probability)
RR ruténiumvörös (ruthenium red)
S.D. Szórás (standard deviation)
S.E.M Standard hiba (standard error of means)
siRNS kis interferáló RNS (small interfering RNA)
SDS Nátrium-dodecilszulfát (sodium dodecyl sulphate)
SUMO kisméretű ubikvintin módosító fehérje (small ubiquitin modifying protein)
TALK TWIK-related **AL**kaline pH-activated **K⁺** channel
TASK TWIK-related **Acid-Sensitive** **K⁺** channel
TG trigeminális ganglion
THIK Tandem pore domain **Halothane-Inhibited** **K⁺** channel
TM(S) Transzmembrán (szegmens)
TRAAK TWIK-Related **Arachidonic Acid-activated** **K⁺** channel
TREK TWIK-RElated **K⁺** channel
TRESK TWIK-RElated **Spinal cord** **K⁺** channel
TRP Tranziens **R**eceptor **P**otenciál (ionsatorna fehérje)
TWIK Tandem of pore domains in a **Weak Inward** rectifying **K⁺** channel
UTR Nemtranszlált régió („untranslated region”)

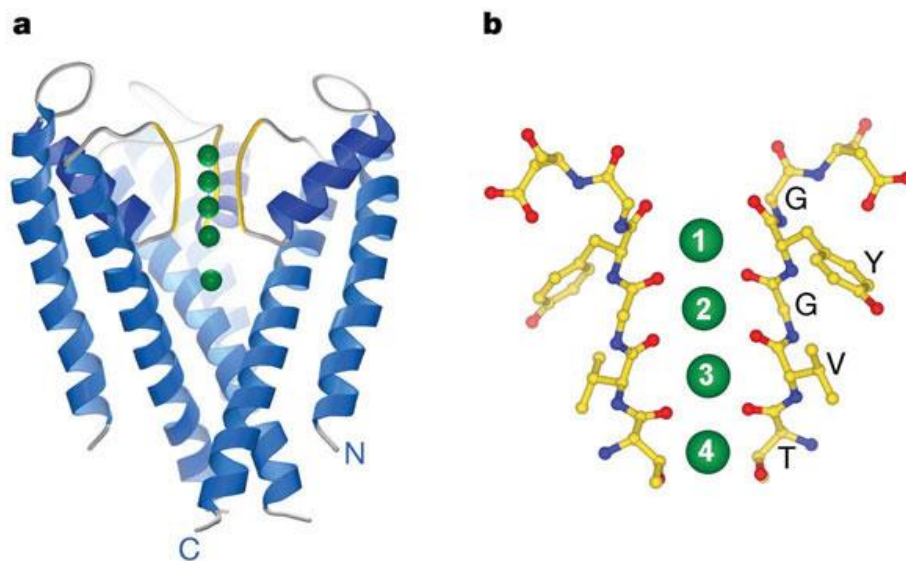
2. Bevezetés

A sejteket a külvilágtól, illetve az egyes intracelluláris kompartmenteket egymástól elválasztó kettős lipid membránok ionokra impermeábilisek. Az ioncsatornák azonban lehetővé teszik, hogy különböző ionok elektrokémiai grádiensüknek megfelelően átjussanak a biológiai membránokon. Az ioncsatornák pórúsán csak az adott csatornára jellemző töltésű és méretű ionok tudnak áthaladni, ezt a tulajdonságukat szelektív permeációnak nevezzük. A káliumcsatornák fontos szerepet játszanak számos élettani folyamatban. Egyik családjukba tartoznak a két pórusdoménnel rendelkező 2P típusú káliumcsatornák (K_{2P}), melyek a befelé rektifikáló káliumcsatornákkal együtt felelősek a nyugalmi membránpotenciál létrehozásáért. Doktori munkám során olyan, a primer érzőidegsejtekben megtalálható K_{2P} csatornákkal foglalkoztam (a TRESK csatornával, illetve a TREK alcsalád tagjaival), amelyeknek szerepe feltételezhető a fájdalom kialakulásában, illetve súlyosságának szabályozásában (1-4).

Káliumcsatornák gyakorlatilag minden élő sejt plazmamembránjában, valamint egyes intracelluláris membránokban is megtalálhatóak (5). Az emberi genomban több mint 90 gén kódol káliumcsatorna alegységet (6). A membránpotenciál, illetve az ingerlékenység szabályozásában betöltött központi szerepüknek megfelelően működésük szigorúan szabályozott és számos élettani folyamatban játszanak szerepet. A különböző káliumcsatornák felépítése eltérő lehet, azonban az ionok áthaladását biztosító szerkezeti elemek minden káliumcsatorna esetén nagyon hasonló felépítésűek. Ez a közös szerkezeti elem 2 transzmembrán (TM) hélixből áll, ezek között található a membrán szintjébe ismét belépő helikális pórusdomén, valamint a szelektivitásért felelős filter hurok. A filter régió „signature” szekvenciája (T(S)XGY(G/L/F), ahol az X tetszőleges aminosavat jelöl) a különböző K^+ -csatornákból gyakorlatilag teljes egyezést mutat (7). Ezen konzervált szekvencia nagy segítséget jelentett a potenciális K^+ -csatornákat kódoló szekvenciák megtalálásában, valamint arról is árulkodik, hogy a csatornák működésében kulcsfontosságú a szelektivitási filter, mint szerkezeti elem (8).

A szelektivitási filtert tartalmazó pórusdomén egy alfa-helikális szerkezetű elem, ami extracelluláris (EC) irányból nyúlik bele a sejtmembránba, azt azonban nem éri át teljesen, hanem visszakanyarodik az EC térbe. A működőképes K^+ -csatorna pórus 4 pórusdomént tartalmaz, melyek együttesen képezik a szelektivitási filter régiót.

A pórus legszűkebb szakaszánál az aminosavak orientációja olyan, hogy a karbonil oxigéncsoportok a hidrofil pórus felé állnak. Ez az elrendezés négy lehetséges ionkötőhelyet hoz létre (ld. 1. ábra). A káliumionok úgy tudnak áthaladni a póruson, hogy hidrátburkukat leadva hozzákötődnek ezen karbonilcsoportok oxigénatomjaihoz. A négy lehetséges kötőhelyet két káliumion, illetve két vízmolekula foglalja el, az ionok az 1,3 és a 2,4 konfiguráció között ingáznak. Abban az esetben ha belép a filterbe egy harmadik káliumion, a másik oldalon található ion kilép a szűrőből. Ez a mozgás energetikailag rendkívül kedvező, ami magyarázza a csatornán keresztül történő ionmozgás rendkívüli sebességét (akár 10^8 ion/s). A filter szerkezete magyarázatot ad a K^+ -csatornák nagyfokú szelektivitására a nátriumionnal szemben, ugyanis a hidrátburkát leadó nátriumion esetén az ion és az oxigénatom közötti kölcsönhatás energetikailag annyira kedvezőtlen, hogy a Na^+ ionok gyakorlatilag nem tudnak bejutni a szelektivitási filterbe, így a csatornán sem jutnak át (9, 10).



1. ábra K^+ kötőhelyek a bakteriális KcsA csatorna pórusában

a, A KcsA csatorna pórusának szalagos ábrázolása látható (a nézőhöz legközelebbi alegység a jobb áttekinthetőség érdekében nincs ábrázolva). A káliumionok (zöld gömbök) a szelektivitási filterben 4 helyen kötődhetnek, valamint kötődnek a membrán közepében található vízzel telt üregben is.

b, Az ábrán a pórus pálcikamodellje látható (a csatorna egyéb részei eltávolítva). A lehetséges kötőhelyek számozottak, az 1-es pozíció van legközelebb az extracelluláris térhez. A szelektivitási filter kialakításában szerepet játszó aminosavak egybetűs rövidítéseit is feltüntettem. (9) alapján.

A különböző K^+ -csatorna alegységeket felépítésük alapján három nagyobb családba soroljuk:

1. A 2 TM szegmenssel (TMS) és 1 pórusdoménnel (P) rendelkező befelé rektifikáló („inwardly rectifying”) K_{ir} -csatornák családja.
2. A 6 TM szegmenssel és 1 P doménnel rendelkező feszültségfüggő K_v -csatornák. Hasonló felépítéssel rendelkeznek a Ca^{2+} -függő K^+ -csatorna alegységek (K_{Ca}), kivéve a K_{Ca} -csatornák közé sorolt BK csatornát, amely 7 TM szegmensből és 1 P doménből áll.
3. A 4 TM szegmenssel és 2 P doménnel jellemzett két pórusdoménnel rendelkező K_{2P} csatornák családja.

Egy működőképes K^+ -csatorna pórus létrejöttéhez 4 pórusdoménre van szükség, így tehát a K_v , K_{Ca} és K_{ir} alegységek tetramereket alkotva funkcióképesek. Ezzel szemben a K_{2P} csatornák dimerizálva hoznak létre működőképes K^+ -csatornákat. Doktori munkám során K_{2P} csatornákkal foglalkoztam, így ezeket mutatom be részletesen. Először az alcsalád általános tulajdonságait, majd ezt követően az általam vizsgált TREK alcsalád és TRESK csatorna jellemzőit és jelentőségüket ismertetem.

2.1. A két pórusdoménnel rendelkező (K_{2P}) háttér káliumcsatornák általános tulajdonságai

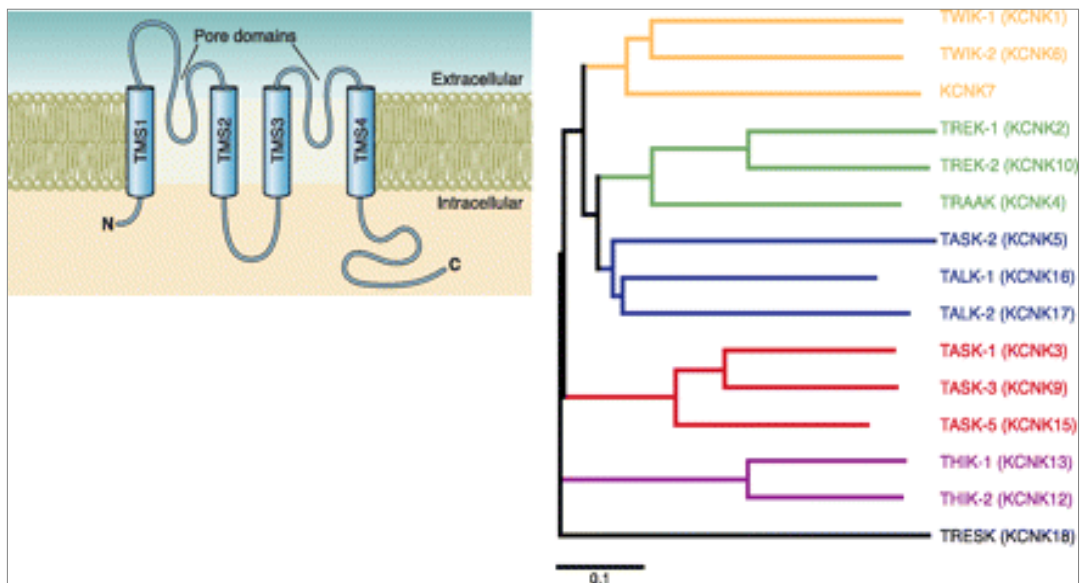
2.1.1. Felfedezés, nevezéktan

Régóta ismert, hogy a plazmamembrán kálium konduktanciája nyugalomban magas (11, 12), az ezért felelős membránfehérjéket, a K_{2P} csatornákat azonban csak jóval később sikerült azonosítani. A K_{2P} csatornák nevüket arról kapták, hogy a négy TM szakaszhoz az egyéb káliumcsatornáktól eltérően nem egy, hanem két pórusdomén társul. Az első 2 pórusdoménnel rendelkező K⁺ csatornát 1995-ben több kutatócsoport egy időben azonosította *Saccharomyces cerevisiae*-ből (13, 14). A TOK1/YORK1 névre hallgató csatornának azonban mind a szerkezete (8TM szakasszal rendelkezik), mind a funkciója (erősen kifelé rektifikál) jelentősen eltér a később azonosított emlős K_{2P} csatornákétól. Ezt követően nem sokkal, 1996-ban írták le az első emlős K_{2P} csatornát, a TWIK-et (Tandem of pore domains in a Weak Inward rectifying K⁺ channel) (15). Jelenleg 15 emlős K_{2P} csatornát ismerünk, a családba sorolás alapja a közös membrántopológia (4TMS/2P), ennek sematikus ábrázolása a 2. ábrán látható (16). A 4TM/2P csatornaszerkezet nem csak gerincesekre jellemző, alacsonyabb rendű állatokban is leírtak hasonló csatornákat pl. *Drosophila melanogaster*-ben (ORK1), illetve *Caenorhabditis elegans*-ban (TWK család) is (17, 18). Találtak 4TM/2P szerkezetű csatornákat növényekben (pl. *Arabidopsis thaliana*) is (19), tehát a 4TM/2P struktúra igen ősi szerkezet.

A K_{2P} csatornákat homológia és funkcióbeli hasonlóság alapján 6 alcsaládba soroljuk. Az alcsaládokba sorolás a család viszonylag kis létszáma ellenére indokolt, ugyanis az alcsaládok közötti különbség fehérjeszinten majdnem akkora, mint egy adott K_{2P} csatorna és más családba tartozó káliumcsatorna között (a K_{2P} csatornák dendrogramja a 2. ábrán látható). Ez a 6 alcsalád a TWIK, a TREK (TWIK-Related K⁺ Channel), a TASK (TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ Channel), a TALK (TWIK-Related Alkaline pH-Activated K⁺ Channel), a THIK (Tandem Pore Domain Halothane-Inhibited K⁺Channel) és a TRESK (TWIK-Related Spinal Cord K⁺ Channel).

A K_{2P} családra a humán genom szervezet (HUGO) létrehozott egy szisztematikus nevezéktant, ahol a géneket (KCNK1-18) és a gének által kódolt fehérjéket K_{2P} 1-18 felfedezésüknek megfelelően sorszámokkal látták el (azonban 8,11 és 14-es sorszámú nincsen).

A szakirodalomban azonban a különböző csatornákat először leíró kutatók által adott, a csatorna valamely tulajdonságára utaló „hagyományos” nevek használata terjedt el. Ehhez a gyakorlathoz dolgozatomban is tartom magam, azonban a különböző csatornák első említésekor feltüntettem a HUGO nomenklatúra szerinti nevet is.



2. ábra A K_{2P} csatornák általános szerkezete és dendrogramja

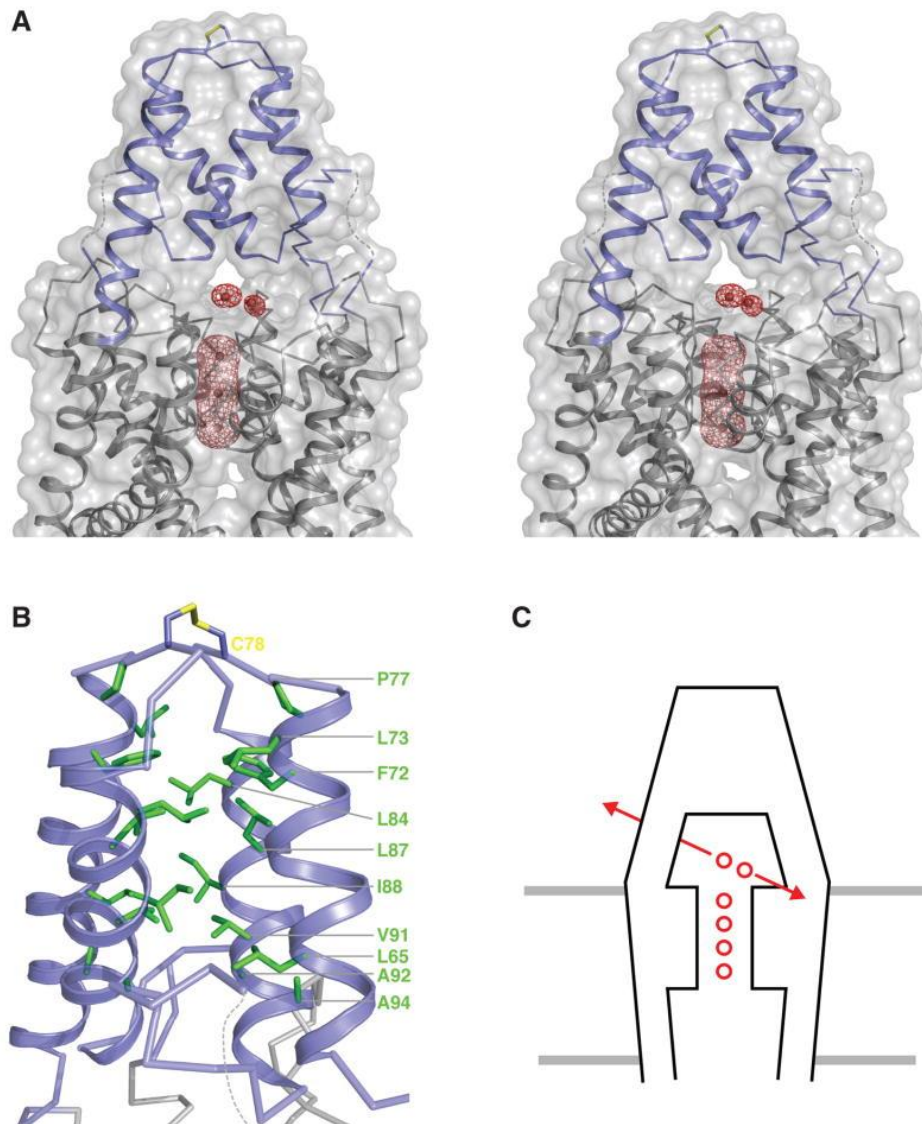
Az ábra bal oldalán az emlős K_{2P} csatornák sematikus transzmembrán topológiája látható. A C-terminális, valamint az TMS2 és TMS3 szakaszok közti intracelluláris hurok hossza az egyes csatornák között jelentősen különbözhet. Az ábra nem méretarányos és a funkcióképes dimernek csak az egyik alegységét ábrázolja. Az ábra jobb oldalán a humán K_{2P} csatornák dendrogramja látható. Az ábrán a csatornáknak mind a konvencionális, mind a HUGO nomenklatúra szerinti neve fel van tüntetve. A KCNK8,11 és 14 csatornák nem léteznek. (16) alapján.

2.1.2. Alapvető szerkezeti tulajdonságok. Az extracelluláris sapka domén

A K_{2P} csatornák működésében fontos szerkezeti elemekre sokáig csak funkcionális és biokémiai vizsgálatok alapján tudtunk következtetni. Az elmúlt pár évben azonban több K_{2P} csatorna kristályszerkezetét is sikerült megfejteni, ami számos kérdésre választ adott (20-23).

A K_{2P} csatornákra jellemző a rövid, intracelluláris N-terminális, ami a TASK csatornák esetén egy endoplazmás retikulum retenciós szignált tartalmaz (24). Szintén intracellulárisan helyezkedik el a 2. és 3. TMS közötti hurok, ami a legtöbb K_{2P} csatorna esetén rövid, a TRESK esetén viszont lényegesen hosszabb. A K_{2P} csatornákat szabályozó hatások többsége a hosszú intracelluláris C-terminálison konvergál, így a C-terminális szerepéről rengeteg adat áll rendelkezésünkre. A TREK alcsalád bemutatásakor ismertetem részletesebben, milyen hatások közvetítésében játszik szerepet a C-terminális.

Az 1. TMS és az 1. pórusdomén között található hosszú, EC elhelyezkedésű hurok szerepéről már a K_{2P} kutatások kezdetén voltak adatok, ugyanis egy olyan cisztein aminosav található ebben a hurokban, amely több csatorna esetében az alegységek dimerizációjához szükséges (25, 26). Ez a hurok egy különleges, más ioncsatornák esetén még nem azonosított domén, az úgynevezett „sapka” (cap) domén kialakításában is részt vesz (ld. 3. ábra). A domén hidrofób magját képező aminosavak nagyfokú konzerváltsága figyelhető meg a K_{2P} alcsaládban. Ez a domén felülről elfedi a csatorna pórusát, a pórushoz csak a membrán felületével párhuzamosan futó extracelluláris ionúton (extracellular ion pathway, EIP) lehet hozzáférni. Ennek a struktúrának a jelenléte meghatározza, hogy milyen méretű és töltésű anyagok férhetnek hozzá egyáltalán a csatorna pórusához. A cap domén jelenléte így tehát magyarázatot adhat arra, hogy a más káliumcsatornák esetén használt klasszikus gátlószerek, amelyek a pórushoz vagy annak közvetlen környezetéhez közel kötődve fejtik ki hatásukat (pl. kvaterner ammóniumszármazékok, 4-aminopiridin, illetve a nagy affinitású peptidtoxinok) miért hatástalanok a K_{2P} család tagjaira.



3. ábra A humán TRAAK sapka doménje és az extracelluláris ionút

A, A helikális sapka domént a membrán síkjából nézzük, felül az extracelluláris oldat látható. A TRAAK fehérjét szürke színnel ábrázolom, a sapkadomént késsel emelem ki. A piros gömbök TI^+ ionokat jelölnek.

B, A sapkadomén kék szalagként, a hidrofób mag pedig zöld pálcákként látható. A két alegységet összekötő diszulfidhíd sárgával van kiemelve.

C, Az extracelluláris ionút sémás modellje (a membrán szürke vonallal, a TRAAK feketével jelölve). A szelektivitási filterben 4 ion található, a sapkadomén alatti vízzel telt üregben pedig egy 5. ion, az extracelluláris ionútban pedig egy 6. ion látható. A sapkadomén mind felülől, mind oldalról elfedi a pórust, így az ionok az extracelluláris ionút mentén (piros nyilakkal jelölve) tudják elhagyni a csatornát. (20) alapján.

2.1.3. Elektrofiziológia

A K_{2P} csatornák elektrofiziológiai tulajdonságaikban számos hasonlóságot mutatnak. Az eddig ismert káliumcsatornák közül a K_{2P} csatornák közelítik meg leginkább a Goldman-Hodgkin-Katz modell szerinti ideális háttér káliumáram tulajdonságait. Az ideális háttér káliumáram nem feszültségfüggő, azaz a nyitvatartási valószínűség (open probability, P_o) független a membránpotenciál értékétől. Emellett a P_o a plazmamembrán két oldalán mérhető káliumkoncentrációtól sem függ. Az ideális háttér káliumáram nem rektifikáló áram (azaz azonos nagyságú, de ellentétes irányú elektrokémiai gradiens azonos nagyságú, de ellentétes előjelű áramot hoz létre). A háttér káliumáram emellett időfüggetlen, a membránpotenciál változásának hatására bekövetkező áramváltozás szinte azonnal létrejön. Ez a háttér káliumáram egy olyan tulajdonsága, ami lényegesen eltér a feszültségfüggő káliumcsatornákétól, ahol a csatornától függően különböző időfüggő változások figyelhetők meg az áram nagyságában (aktiválási vagy inaktiválási kinetika). Annak ellenére, hogy a K_{2P} csatornák működése mutat valamennyi feszültségfüggést (27), illetve egyes csatornák esetén az áram rektifikációja is megfigyelhető (pl. a később részletesen ismertetett TREK-1 esetében is), kijelenthetjük, hogy ezeken a csatornákon átfolyó áram valóban jól közelíti a háttér (vagy más néven csurgó, „leak”) K^+ -áram tulajdonságait.

2.2. A TREK alcsalád K^+ -csatornáinak általános jellemzése

2.2.1. Biofizikai sajátosságok

A TREK (TWIK-Related K^+ channel) alcsalád első tagját, a TREK-1-et ($K_{2P}2.1$, KCNK2) másodikként írták le a K_{2P} csatornák közül (28). Az alcsaládba tartozik még a TREK-2 ($K_{2P}10.1$, KCNK10) és a TRAAK (TWIK-Related Arachidonic Acid stimulated K^+ channel, $K_{2P}4.1$, KCNK4) is (29-31). A TREK-1 és TREK-2 aminosav szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat, ami elsősorban a TMS-ek és a C-terminális szakaszok között figyelhető meg. A TREK alcsalád mindhárom tagjánál előfordulnak alternatív hasítási („splice”) variánsok, ezek többsége az első exont érinti, így az eltérés az N-terminális szakasz hosszában mutatkozik meg (32-34). A variánsok legfontosabb funkcionális tulajdonságaikban megegyeznek, jelentőségük még nem ismert. Ennek ellenére kifejeződésük jelentős szövetspecifitást mutat. A TREK-1 és TRAAK csatornák esetén azonban ismertek olyan hasítási variánsok is, amelyek esetén nem csonka, nem teljes hosszúságú fehérje keletkezik. Ezek nem képeznek működőképes csatornát, a TREK-1 variáns pedig domináns negatív hatást fejt ki a teljes hosszúságú fehérjére, csökkenti annak kijutását a plazmamembránba, ami az áram csökkenéséhez vezet. A rövid TRAAK variáns nincs hatással a teljes hosszúságú csatorna tulajdonságaira, jelentőségének megismerése még várat magára (30, 35). A TREK-1 és TREK-2 esetén tovább növeli a keletkező fehérjék sokszínűségét, hogy egy mRNS-ről többféle működőképes csatorna keletkezhet az alternatív transzlációs iniciáció mechanizmusának (egy mRNS-en több lehetséges transzlációs kezdőpont található) köszönhetően (36, 37).

A TREK-1 csatorna áram-feszültség karakterisztikája az ideális háttér K^+ -áramtól eltérően nem lineáris, hanem kifelé rektifikáló (28). A rektifikációért az extracelluláris oldal oldalláncaihoz kötődő divalens kationok (Mg^{2+} és Ca^{2+}) felelősek, hasonló módon ahhoz, ahogyan a befelé rektifikáló káliumcsatornák esetében a rektifikációért az intracelluláris (IC) Mg^{2+} (vagy spermin) felelős (38, 39). Extracelluláris Mg^{2+} és Ca^{2+} hiányában azonban a csatorna I-V görbéje közel szimmetrikus (hasonlóan az alcsalád többi tagjához). A rektifikáció kialakulásában szerepet játszik még a csatorna enyhe feszültségfüggése is.

A csatorna nyitvatartási valószínűsége (P_o) ugyanis depolarizált membránpotenciál értékeken magasabb, mint ami negatív membránpotenciál értékeken mérhető (40, 39, 27). A csatorna feszültségfüggő szabályozásáért a C-terminális felelős, annak delécíója vagy más, nem feszültségfüggő K_{2P} csatorna C-terminálisára való lecserélése megszüntette a csatorna feszültségfüggését (40).

A TREK-1 esetén két eltérő egyedi csatorna vezetőképesség értéket határoztak meg heterológ rendszerekben: egy magasabbat (kb. 100 pS) és egy alacsonyabbat (kb. 40 pS). A jelenség háttérében a korábban említett alternatív transzlációs iniciáció jelensége áll. Mivel a TREK-1 gén gyenge Kozak szekvenciával rendelkezik, a transzláció indulhat egy belső, alternatív start kodonról is, ami 56 aminosavval kisebb csatornát eredményez. A rövidebb csatorna egységárama nagyobb, viszont P_o értéke kisebb, mint a teljes hosszúságú csatornáé. Meglepő módon a rövidebb N-terminálissal rendelkező csatorna ionszelektivitása is megváltozik, permeábilisabbá válik Na^+ -ra, ami élettani körülmények között a sejt depolarizációjához vezet (37).

A TREK-2 csatorna esetében szintén megfigyelhető a csatorna feszültségfüggése, a membrán depolarizációja növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét (29, 31, 27). A csatorna egyedi csatorna vezetőképessége azonban csökken pozitívabb membránpotenciálokra, így teljes sejtes mérések esetén a TREK-2 csatornát közel lineáris I-V összefüggés jellemzi (29, 38, 31). A TREK-1-hez hasonló módon a TREK-2 esetében is megfigyelhető az alternatív transzlációs iniciáció jelensége, ami eltérő vezetőképességű, viszont megtartott szabályozású és ionpermeabilitási tulajdonságokkal rendelkező csatornák keletkezéséhez vezet. A teljes hosszúságú fehérje felelős az alacsonyabb vezetőképességért (kb. 50 pS), míg a csonka N-terminálisú fehérje a nagy konduktanciájú (kb. 200 pS) TREK-2 csatornát hozza létre (36).

A TRAAK csatorna I-V összefüggése a TREK-2 csatornáéhoz hasonlóan közel lineáris. Működése az alcsalád többi tagjához hasonlóan szintén mutat mérsékelt feszültségfüggést. Egyedi csatorna vezetőképessége kb. 50 pS. A TRAAK esetében nem ismertek eltérő vezetőképességű variánsok (30, 38).

2.2.2. Előfordulásuk a szervezetben

A TREK alcsalád tagjainak előfordulását mind rágcsálókban, mind emberben alaposan feltérképezték. A TREK-1 és TREK-2 kifejeződése különösen magas a központi idegrendszer neuronjaiban mind embrionális, mind felnőtt korban (41-43). Felnőtt egerek központi idegrendszerében a TREK-1 elsősorban az agykéregben, a striatumban, a hypothalamusban, a hippocampusban és az amgydalában mutatható ki. A TREK-2 alegység pedig elsősorban a hippocampusban, a striatumban, a szaglóhagymában (bulbus olfactorius) és a kisagyi szemcsesejtekben fordul elő. A TREK-1 és TREK-2 nemcsak neuronokban fordulnak elő, mindkét alegység kimutatható kérgi asztroglia sejtekben is (44, 45). A TRAAK alegység embrionális korban alacsony mennyiségben mutatható ki az egér központi idegrendszerében, mennyisége viszont születés után emelkedni kezd. Felnőtt egerekben a TRAAK alegység az agykéregben, a gerincvelőben és a retinában mutatható ki (30, 43). A TREK és TRAAK csatornák a perifériás idegrendszerben is jelen vannak. Nagy mennyiségben kimutathatóak a hátsó gyöki ganglion és a trigeminális ganglion primer szenzoros idegsejtjeiben, valamint a szimpatikus idegrendszerhez tartozó felső nyaki ganglionban (ganglion cervicale superius) is (46-49). A TREK-1 és TRAAK kimutatható a viscerális afférenseket tartalmazó ganglion nodosumban is (50).

A TREK-1 számos szervben kimutatható az idegrendszeren kívül is: üreges zsigeri szervek és különböző erek (pl. tüdőartéria, agyi erek) simaizomsejtjeiben, egyes érterületek endothel sejtjeiben, a tüdőben, a szívben, a vesében és a mellékvesekéregben (51-55). A TREK-2 nagyobb mennyiségben kifejeződik a lépben, a hasnyálmirigyben, a herében és a vesében, kisebb mennyiségben pedig kimutatható a májban, a méhlepényben, a tüdőben, a pitvarban és egyes bélszakaszok simaizomzatában (29, 31, 34, 56). A TRAAK alegységről sokáig úgy gondolták, hogy kizárólag az idegrendszerben fejeződik ki, nemrég azonban kimutatták jelenlétét a méh simaizomzatában (55).

2.2.3. Szabályozásuk

A TREK alcsalád tagjainak működését nagyszámú, jellegében nagyon különböző tényező szabályozza. A TREK csatornák egyaránt érzékenyek mechanikai ingerekre és a hőmérséklet változásaira. A szervezetben előforduló különböző lipidek fokozzák működésüket, a TRAAK csatorna nevét is erről kapta. Mind az intra-, mind az extracelluláris pH változásai befolyásolják a TREK csatornák aktivitását. A TREK-1 és TREK-2 működését ezenkívül G-fehérje kapcsolt receptorok által beindított jelátviteli folyamatok és különböző adapterfehérjékkel való kölcsönhatások is befolyásolják.

Ha a TREK alcsalád tagjait kifejező sejteket mechanikai inger éri, a csatornák nyitvatartási valószínűsége megváltozik (38, 31, 26). Hiperozmoláris környezetben csökken a TREK/TRAAK áram nagysága. Ezzel szemben a patch pipettán keresztül leadott negatív (szubatmoszférikus) nyomás, ami a sejtek duzzadásához hasonlóan deformálja a plazmamembránt, fokozza a TREK áramot. A mechanikai ingerre adott válasz reverzibilis és függ a kiváltó inger nagyságától. A TREK-1 áramot lamináris nyíróerő is aktiválja (26).

A TREK alcsalád mechanoszenzitivitásáért a plazmamembrán és a csatornák közötti direkt kölcsönhatás felelős. A csatornák mechanikai ingerekre ugyanis sejtmentes rendszerekben is reagálnak (57, 58). Intakt sejtekben a citoskeletális rendszer is befolyásolja (gátolja) a csatornák működését, ugyanis a citoskeletális hálózat roncsolása farmakológiai eszközökkel (colchichin, cytochalasin D) serkentő hatást fejt ki a csatornákra (38, 59). A mechanoszenzitivitásért elsősorban a 4. TMS, illetve az ezt követő citoplazmai domén kezdeti szakasza felelős, ezeket a csatornarészleteket funkcionális vizsgálatokkal, illetve nyitott és zárt állapotban lévő csatornák szerkezetének összehasonlításával azonosították (57, 21, 38, 22, 39).

A TREK csatornák aktivitását a hőmérséklet emelkedése reverzibilis módon fokozza a 14-42 °C-os hőmérsékleti tartományban, ez a hatás a TREK-1 esetén a legerőteljesebb, ahol a 22 °C-ról 42 °C-ra melegítés 7-szeresére fokozta a TREK-1 áramot (47, 26). Az áram növekedését a csatorna P_o emelkedése magyarázza, az egységáram nagysága ugyanis nem változik. A TREK alcsalád termoszenzitivitása azonban csak sejtés környezetben érvényesül, kitépelt membránfoltokban nem figyelhető meg (ellentétben a csatornák mechanoszenzitivitásával).

Ez arra utal, hogy a termoszenzitivitásért valamilyen kiegészítő fehérje felelős. Ebben az esetben viszont ennek a partnerfehérjének a kifejeződése rendkívül széleskörű, ugyanis a csatornák hőmérsékletérzékenysége hasonló volt a csatornákat endogénen kifejező sejtekben és különböző expressziós rendszerekben (COS-7 sejtekben, sőt *Xenopus* petesejtekben) is (26).

A TREK alcsalád tagjainak aktivitását az intra- és extracelluláris pH egyaránt befolyásolja. Az IC oldat pH csökkenése serkenti a TREK-1 és TREK-2 működését, valamint fokozza érzékenységüket mechanikai ingerek iránt (60, 31, 61). A protonérzékenységért a TREK-1 esetén a 306-os glutamát, a TREK-2 esetén az ezzel homológ 333-as glutamát felelős (60, 61). A TREK-1 és TREK-2-vel szemben a TRAAK áramot az IC pH csökkenése nem befolyásolja, annak ellenére, hogy a csatornában a TREK-1 306-os glutamátjának megfelelő pozíciójában szintén glutamát található. Ezzel szemben a TRAAK áramot a pH növekedése aktiválja (38). A TREK-1 és TREK-2 csatornák működését az extracelluláris (EC) pH is befolyásolja az élettani pH tartományon belül. A TREK-1 esetén a pH csökkenése gátolja a csatornát, a TREK-2 esetében viszont az áram fokozódása figyelhető meg (62-64). Mindkét csatorna esetében egy, az első EC hurokban található konzervált hisztidin felelős a pH érzékelésért, a csatornaaktivitásra kifejtett eltérő hatásért pedig a 2. pórusdomén és 4. TMS közötti szakasz felelős. A TREK-1 esetében ezen a szakaszon negatív, a TREK-2 esetében pedig pozitív töltésű aminosavak találhatóak, így ha a pH-szenzor hisztidin protonálódik, a TREK-1 esetében elektrosztatikus vonzás alakul ki a két csatornaszakasz között, míg a TREK-2 esetében a két szakasz taszítani fogja egymást (64).

A TREK csatornák működését különböző lipidmediátorok is befolyásolják. Az arachidonsav aktiválja az alcsalád mindhárom tagját, a TRAAK csatorna a nevét is erről kapta. Hasonló aktiváció egyéb többszörösen telítetlen zsírsavak esetén is megfigyelhető, ezzel szemben a telített zsírsavak nem befolyásolják a csatornák működését (29, 65, 30, 31). A csatornákra kifejtett hatásuk közvetlen, sejtmentes környezetben is létrejön, viszont szükség van a C-terminálisra a hatás kialakulásához (30, 38, 60, 39). Az IC pH csökkenéshez hasonlóan fokozzák a csatornák érzékenységét mechanikai ingerekre. Intakt sejtekben a különböző lizofosfolipidek is fokozzák a TREK alcsalád aktivitását, ez azonban sejtmentes környezetben nem figyelhető meg.

Ez arra utal, hogy a hatás közvetett (31, 66). A lizofoszfátid sav azonban sejtmentes rendszerben is aktiválja a TREK-1 áramot (67, 66). A sejtmembrán negatív töltésű foszfolipidjei, a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP_2) és a foszfatidil-szerin a TREK-1-et sejtmentes környezetben is aktiválják (68, 69). Feltételezhető, hogy a hatásért a csatorna C-terminális pozitív töltésű aminosav oldalláncai és a foszfolipidek negatív töltései közötti elektrosztatikus kölcsönhatások felelősek. A foszfolipidek negatív töltéseinek lefedése polilizinnel ugyanis a csatorna aktivitásának csökkenéséhez vezet (69). Sejtmentes rendszerben a diacilglicerol gátolja a TREK-1 és TREK-2 csatornákat (70).

A TREK-1 és TREK-2 csatornák áramát különböző G-fehérje kapcsolt receptorok heterológ rendszerekben és a csatornákat endogéne kifejező sejtekben egyaránt szabályozzák. Az áram nagyságát a G_s -kapcsolt receptorok ingerlése csökkenti, G_i -kapcsolt receptor ingerlése pedig növeli. (71, 28, 26, 72) A receptor általi gátlásért a protein kináz A (PKA) aktivitása felelős, a TREK-1 333-as szerin oldalláncának foszforilációja okozza a csatorna gátlását, TREK-2 esetén pedig a 359-es szerin foszforilációja felelős a PKA hatásáért (28, 26). A G_q -fehérje kapcsolt receptorok ingerlése szintén gátolja a TREK-1 és TREK-2 áramot, a gátló hatásért a protein kináz C (PKC) általi foszforiláció felelős. A TREK-1 esetén a 300-as, TREK-2 esetében pedig a 326-os szerin a PKC célpontja, a gátlás kialakulásában szerepet játszhat a plazmamembrán PIP_2 és diacilglicerol szintjének változása is (28, 73). Különbség a TREK-1 és TREK-2 csatornák között, hogy a TREK-1 működését fokozza a nitrogén-monoxid-cGMP-protein kináz G jelvény is a 351-es szerin foszforilációján keresztül, ez az aminosav azonban nem található meg a TREK-2 csatornában (74). A TRAAK csatorna aktivitását sem a PKA, sem a PKC nem befolyásolja.

A TREK-1 és TREK-2 csatornák működését partnerfehérjék is befolyásolják. Ezek egyike az idegi jelátviteli komplexek kialakításában ismert szerepet játszó állványfehérje, az A-kinase anchoring protein 150 (AKAP-150), amely a TREK csatornák C-terminálisához kötődik (75). Az AKAP150 növeli a csatornák alapaktivitását, valamint megszünteti a TREK áram feszültségfüggését. Az ismert serkentő stimulusok (IC pH, nyújtás, arachidonsav) nem fokozzák tovább az áramot, valamint a PKC általi foszforiláció is akadályozott.

Ezzel szemben a csatorna PKA általi gátlása megtartott, sőt a TREK-1 $\beta 2$ adrenerg receptor általi gátlása felgyorsult, ami utalhat arra, hogy a receptort és a csatornát az AKAP150 közös fehérjekomplexbe rendezi (75). Az AKAP150 kötőhelytől távolabb található egy mikrotubulus-asszociált fehérjének, az Mtap2-nek (microtubule-associated protein 2) a kötőhelye. Az Mtap2 fokozza a csatornák felszíni kifejeződését anélkül, hogy változtatna a csatorna tulajdonságain (76). Hasonlóan növeli a TREK-1 csatorna sejtfelszíni kifejeződését a β -COP fehérje, amely a csatorna N-terminálisához kötődik (77).

2.2.4. Farmakológiai tulajdonságok

A TREK csatornák áramát a többi K_{2P} csatornához hasonlóan nem befolyásolják a klasszikus káliumcsatorna gátlószerek, mint például a 4-AP vagy a Cs^+ . A kvaterner ammóniumionok és a Ba^{2+} is csak magas koncentrációban gátolja őket. Működésüket azonban számos egyéb célra használt vegyület befolyásolja. Aktivitásukat fokozzák az illékony anesztetikumok, mint pl. a halotán és az izoflurán (78). A TREK-1 KO állatok kevésbé érzékenyek illékony anesztetikumokra, mint vad típusú társaik, magasabb koncentrációban kell alkalmazni a szereket és lassabban is alakul ki a hatásuk (79). A neuroprotektív hatású riluzol szintén aktiválja a TREK-1 és TRAAK áramot, azonban a kezdeti aktiváció után a TREK-1 esetében az áram csökkenése figyelhető meg. A jelenség hátterében az állhat, hogy a riluzole a cAMP szintet is emelni a sejtekben, a következményes PKA aktiváció pedig a TREK-1 csatorna gátlását okozza (46). Más gyógyszerként használt vegyületek, mint például a helyi érzéstelenítők (pl. lidokain), több antidepresszáns (fluoxetin, citalopram), antipszichotikum (klórpromazin,, haloperidol) és az antiepilepsziás szerként használt sipatrigine viszont gátolják a TREK csatornák működését (80-84). Munkacsoportunk írta le egy polikationos festékről, a ruténiumvörösről (Ruthenium Red, RR), hogy a TRAAK ,TREK-2 és TASK-3 csatornákat gátolja, más K_{2P} csatornákra viszont nem hat, segítségével tehát a TREK-1 és TREK-2 áram elkülöníthető egymástól (85, 86). Ezek a farmakológiai szerek lehetőséget teremtettek arra, hogy a TREK áramot azonosítani lehessen natív sejtekben, egyéb célpontjaik miatt azonban alkalmatlanok arra, hogy *in vivo* szelektíven módosítani lehessen velük a TREK csatornák működését.

A TREK alcsalád tagjai több kórélettani állapotban szerepet játszanak (ld. következő alfejezet), így megfelelő szelektivitású TREK csatorna modulátorok előállítása a gyógyszeres terápia szempontjából is ígéretes lehet (2, 87). Emiatt számos TREK csatornát moduláló szerről számoltak be az irodalomban, melyek többségének szelektivitását (akár csak a K_{2P} családon belül) nem vizsgálták részletesen (88-92).

Kivétel ez alól a sortillin (más néven 3-as típusú neurotensin receptor) fehérje érése során keletkező, a spadin (93). Ez a peptid ugyanis a TREK-1 csatorna hatékony és potens ($IC_{50}=71$ nM) gátlószere, viszont a vizsgált egyéb K_{2P} (TREK-2, TRAAK, TASK és TRESK) és K_v csatornák működését nem befolyásolja (93, 94). A peptid kémiai módosításával még nagyobb affinitású gátlószereket lehet előállítani (95). A spadin *in vivo* antidepresszáns hatást fejt ki, ami összhangban áll azzal, hogy a TREK-1 KO állatok depresszióra rezisztens fenotípust mutatnak (ld. később). A TREK csatornákra ható szereket (a TRESK csatornára ható anyagokkal együtt) táblázatos formában is összefoglaltam, a táblázat a 2.3.4. fejezet végén található.

2.2.5. Élettani-kórélettani jelentőségük

A központi idegrendszer fejlődése során kiemelt jelentősége van az idegsejtek citoskeletonjának átrendeződésének, ugyanis a sejtek alakjának változása, illetve nyúlványaik terjeszkedése az alapja az idegsejtek közötti megfelelő kapcsolatok kialakulásának. Az *Aplysia* tengeri csiga esetén ismert, hogy az idegsejtek növekedési kúpjaiban egy háttér káliumcsatorna fejeződik ki, ami fontos szerepet játszik a neuritok növekedésében (96). Az ezen a csatornán folyó háttér káliumáram tulajdonságaiban hasonlít az emlős TREK-1 csatorna áramához. Ismert, hogy az emlősök központi idegrendszerében magas a TREK-1 kifejeződése embrionális korban, valamint újszülöttekben is. Így adott a lehetőség, hogy a TREK csatornák emlősökben is szerepet játsszanak a növekedési kúpok kialakulásában.

Patkány hippocampusból izolált idegsejtekben a TREK-1 (vagy TREK-2) csatornák kifejeződésének fokozódása esetén megváltozik a sejtek morfológiája, megnő a növekedési kúpok száma. TREK-1 génhianyos egerekből izolált idegsejtek esetén pedig csökkent a növekedési kúpok mennyisége a vad típusú neuronokhoz képest. A TREK-1 ezekben a kúpokban a citoskeleton elemeivel együtt található meg.

A növekedési kúpok számát fokozó hatás akkor is létrejött, ha a csatorna működését gátolták, tehát nincs összefüggésben a csatorna aktivitásával (59). Ennek ellenére talán meglepő módon a felnőtt TREK-1 génhányos egerek agyi struktúrái anatómiailag épnek tűnnek (79).

A többszörösen telítetlen zsírsavak neuroprotektív hatásai régóta ismertek. A központi idegrendszerben található TREK csatornákat ezek a zsírsavak (pl. linolénsav, arachidonsav) aktiválják, ami a membránpotenciál hiperpolarizálásával a sejtek ingerlékenységének csökkenéséhez vezet (97, 79). Hasonló módon fejtheti ki hatását a riluzole is, annak ellenére, hogy a szer kezdetben közvetlenül aktiválja a csatornát, majd a cAMP szint emelésével a TREK áram gátlásához vezet (98). Az excitatorikus citotoxicitás és agyi iszkémia *in vivo* modelljeiben a TREK-1 génhányos egerek idegsejtjeinek fokozott elektromos aktivitása hozzájárulhat a vad típusú társaikhoz képest megfigyelhető súlyosabb fenotípushoz (79).

Ismert, hogy a hő- és fájdalomérzékelésért elsősorban a nemspecifikus kationcsatornák közé tartozó **Tranziens Receptor Potenciál** csatornák (TRP) felelősek (pl. TRPV1-4, TRPM8, TRPA1). A TREK csatornák termoszenzitivitása és nagyfokú kifejeződése a primer szenzoros idegsejtekben felveti annak a lehetőségét, hogy működésükkel csökkenthetik a különböző szenzoros ingerekre kialakuló depolarizáció mértékét, így csökkentve az idegsejtek ingerlékenységét. Mind a TREK-1 és TRAAK KO egerek érzékenyebbek voltak hő-, mechanikai és hiperozmotikus stimulusokra, mint vad típusú társaik, a különbség a szubmaximális ingertartományban volt a legnagyobb (1, 99). A TREK csatornákra ennek megfelelően új fájdalomcsillapító gyógyszerek lehetséges terápiás célpontjaként tekintenek (2, 99).

A klinikai gyakorlatban antidepresszánsként használt, szelektív szerotonin visszavétel-gátló fluoxetin, illetve aktív metabolitja a norfluoxetin a TREK-1 és TREK-2 áram potens gátlószerei. Mivel a TREK-1 olyan agyi területeken fejeződik ki (pl. hippocampus, prefrontalis kéreg), amelyek kapcsolatba hozhatóak a depresszió során fellépő kognitív és viselkedésbeli zavarokkal, felmerült annak a lehetősége, hogy a csatorna aktivitása befolyásolhatja a depresszió kialakulását. A TREK-1 KO egerek a depressziós viselkedés különböző állatmodelljeiben depresszióra rezisztens fenotípust mutattak, ami hasonló volt az antidepresszáns kezelést kapott vad típusú egerek fenotípusához (100).

Emellett a KO egerek szerotoninerg idegsejtjeinek tüzelési frekvenciája fokozott volt vad típusú társaikéhoz képest. Hasonló eredményeket kaptak vad típusú egerekben a szelektív TREK-1 gátló peptid, a spadin alkalmazásával is, alátámasztva azt az elképzelést, hogy a TREK-1 gátlása új lehetőség az antidepresszáns terápiában (93).

Az idegrendszeren kívül is ismert a TREK alcsalád tagjainak élettani szerepe különböző élettani-kórélettani folyamatokban. A szívben a TREK-1 egyaránt kimutatható a munkaizomzatban, az ingerképző- és vezető rendszerben, valamint a fibroblastokban is (101-103, 34). A TREK-1 szerepet játszik ezen sejtek nyugalmi membránpotenciáljának meghatározásában, illetve különböző élettani stimulusokra adott (pl. adrenerg receptorok aktivációja, mechanikai nyújtás) válaszában. Feltételezhető, hogy a TREK-1 aktivációja különböző tényezők által (pl. IC acidózis, arachidonsav, többszörösen telítetlen zsírsavak) kardioprotektív hatású lehet iszkémiás állapotokban (104, 102, 34). A TREK-1 hiánya esetén mind az ingerképző és vezető rendszer, mind a munkaizomzat működése károsodott (101, 105, 103). Érdekes módon a TREK-1 gén fibroblasztokban történő szelektív törlése esetén csökkent mértékű fibrózis volt megfigyelhető egy hipertrófiás kardiomiopátia modellben, amit a szerzők a mechanikai feszülés hatására beinduló, hipertrófiát okozó jelátviteli útvonalak károsodásával magyaráznak (101). Az ioncsatornáknak nemcsak a hiánya, hanem megváltozott vagy túlzott működése is okozhat kóros fenotípust. Egy több száz ismeretlen eredetű szívritmuszavarban szenvedő betegpopulációban azonosítottak olyan TREK-1 mutációt, amely a csatornát Na^+ -ra permeábilissá teszi, így a csatorna aktivitása depolarizációhoz és kamrai ritmuszavarok kialakulásához vezet (106).

Bizonyos üreges zsigeri szervekben (pl. húgyhólyag, méh) a fal fokozott feszülése a simaizom elernyedéséhez vezet. E hatás közvetítésében szerepet játszanak a feszülés hatására aktiválódó, így a simaizomsejteket hiperpolarizáló TREK csatornák (74, 107, 108).

A TREK-1 kimutatható agyi, zsigeri és bőrerek simaizom és endothelsejtjeiben. Ezeken az érterületeken fontos szerepet játszanak a többszörösen telítetlen zsírsavak által kiváltott, valamint az endotél eredetű érrelaxáció folyamatában, a csatorna genetikai hiánya esetén az erek relaxációja zavart szenved (51, 109, 53). A TREK-1 és TREK-2 csatornák mRNS-e kimutatható a kisvérköri erek simaizomsejtjeiben is, az ott betöltött esetleges szerepük megismerése azonban még várat magára (74).

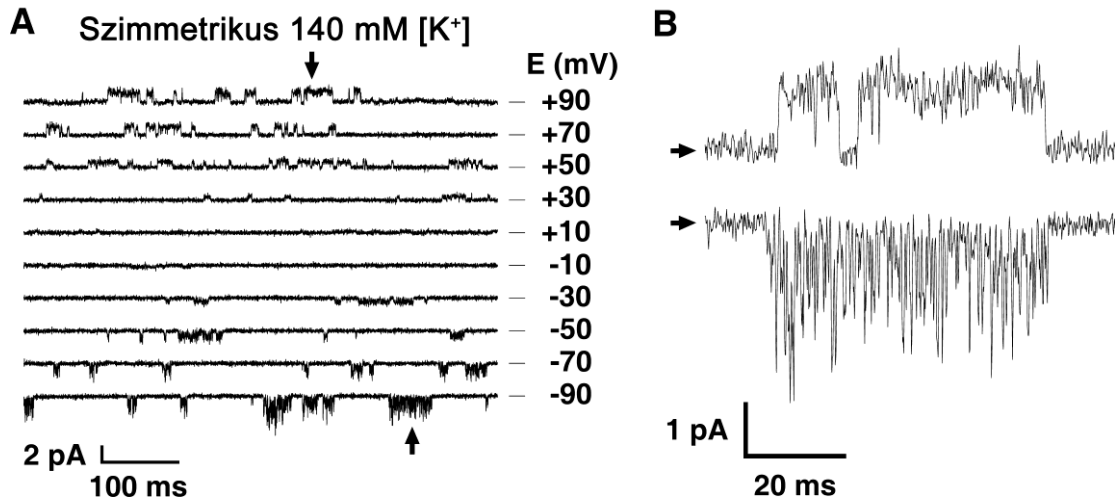
A mellékvesekéreg szteroidtermelő sejtjeiben is megtalálhatóak a TREK csatornák, ahol a membránpotenciál beállításán keresztül szerepet játszanak a szteroidtermelés szabályozásában (110, 111). A háttér káliumáramért felelős csatornák fajoként eltérőek, a szarvasmarha esetén a TREK-1 a fő K_{2P} csatorna, emberi mellékvesekéregben a TREK-1 mellett TASK-1 és TASK-3 is kimutatható, rágcsálókban viszont a TASK-3 dominál (112, 113, 111).

2.3. A TRESK háttér K^+ -csatorna általános jellemzése

2.3.1. Felfedezése, különleges egyedi csatorna jellemzők

A TWIK-Related Spinal Cord K^+ channel (TRESK; $K_{2P}18.1$) csatorna egyedüli tagja az utolsóként azonosított K_{2P} alosaládnak. Nevét arról kapta, hogy 2003-ban emberi gerincvelőből sikerült megklónozni (114). Nem sokkal ezt követően munkacsoportunk egér kisagyból (115) azonosította az egér TRESK csatornát is. A csatorna megtalálható alsóbbrendű gerincesekben, pl. zebradánióban (*Danio rerio*) is (116). A humán TRESK fehérje 384, míg az egér 395 aminosavból áll. Az egér és humán csatorna aminosav-szekvenciája más K_{2P} csatornához képest csak viszonylag kis mértékben (67%-ban) egyezik meg egymással. Egyes korai tanulmányok emiatt feltételezték több TRESK gén létezését (117), azonban a későbbiekben bebizonyosodott, hogy mind az egér, mind az emberi genom csak egy TRESK gént tartalmaz. A csatornában megtalálhatóak a K_{2P} családra jellemző általános szerekezeti elemek (4 TMS, 2 pórusdomén, extracelluláris sapka domén). Lényeges különbség viszont a többi K_{2P} csatornához képest a jelentősen hosszabb intracelluláris hurok (ez a TRESK esetében több, mint 120 aminosav, míg más K_{2P} csatornák esetében csupán 20-30 aminosav), illetve a rövid C-terminális farok (ez a szakasz csupán 30 aminosav hosszú a TRESK esetében, szemben más K_{2P} csatornákkal, melyek esetében akár 120 aminosav is lehet).

Az egér TRESK csatorna egyedi csatornás (single channel) mérések során (szimmetrikus (140 mM) K^+ -koncentrációjú oldatokban) különleges viselkedést mutatott (4. ábra). Depolarizált membránpotenciálokön négyszögjelre hasonlító megnyílásokat láthatunk (az ábrán a felfelé történő kitérések felelnek meg a csatorna nyitott állapotának, átlagos nyitvatartási időtartalmuk kb. 1 ms), a csatorna vezetőképessége ilyenkor 13 pS. Hiperpolarizált membránpotenciál értékek esetén viszont egymást sorozatban gyorsan követő rövid (kb. 0,5 ms) megnyílások jellemzőek (115). Ez az aszimmetrikus viselkedés szimmetrikus K^+ -ban felhasználható a csatorna azonosítására natív szövetekben a kitépelt foltos („excised patch”) patch clamp technika felhasználásával (48).



4. ábra A TRESK csatorna aszimmetrikus viselkedése

A, Reprezentatív felvétel egyedi TRESK csatornáról különböző feszültségértékeken. A mérés egér TRESK-et kifejező *Xenopus* petesejtéből kitépett membránfolton készült.

B, Az A panelen nyilakkal jelölt eseményeket kinagyítva mutatom. A +90 mV-on mért, kifelé irányuló áram négyzetjel-szerű, míg a -90 mV-on mért, befelé irányuló áram gyorsan ingadozik a nyitott és zárt állapot között, "nyitott csatorna zajt" mutat. Módosítva (29) alapján

2.3.2. Kifejeződése a szervezetben

A TRESK csatorna kifejeződését első leírói RT-PCR technika segítségével (humán szövetekből készült cDNS könyvtárat felhasználva) kizárólag a gerincvelőben tudták kimutatni (114). A későbbiekben azonban az idegrendszer számos egyéb területén (DRG, TG, nagyagy, kisagy, agytörzs, vegetatív ganglionok), illetve néhány nem idegi szövetben is (here, lép, tímusz) sikerült TRESK mRNS-t kimutatni (115, 118, 119, 117, 49). Immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a csatorna fehérjeszinten is kimutatható több idegrendszeri struktúrában is, mint például a DRG idegsejtben és a kisagyban (120). A K_{2P} csatornák elleni antitestek azonban rendkívül nehézkesen használhatóak és megbízhatatlanok, ami okot ad ezen eredmények kellő óvatossággal való fogadására. Megfelelően szelektív farmakológiai eszközök hiányában a TRESK fehérje kimutatásának legmegbízhatóbb módja a csatorna egyedi csatornás mérésekkel való azonosítása (felhasználva aszimmetrikus viselkedését különböző membránpotenciálokon). Fáradtságos munkával sikerült így igazolni a TRESK jelenlétét DRG idegsejtben (48). A csatorna kifejeződési profiljának ismeretében felmerülhet a TRESK mozaikszo alternatív értelmezése is (TWIK-Related **Sensory** K⁺ channel).

2.3.3. Egyedülálló kalciumfüggő szabályozás

A TRESK csatorna működését számos más K_{2P} csatornához hasonlóan (pl. TASK-1/3, TREK-1/2) befolyásolja a G_q -fehérje-kapcsolt receptorok aktivációja (115). A K_{2P} csatornák körében egyedülálló módon azonban a receptor aktivációja a TRESK áram aktivációjához vezet, ennek a jelátviteli útnak az elemeit munkacsoportunk korábbi munkáiban írta le. A *Xenopus* petesejt expressziós rendszerben kifejezett TRESK csatorna (egér vagy humán) áramát a G_q -fehérje-kapcsolt receptor aktivációja gyorsan (1-2 perc alatt) többszörösére aktiválta. Ha a petesejtekben akadályozott a kalciumjel kialakulása (pl. kalciumkelátor EGTA injektálásával), akkor nem jön létre a TRESK áram aktivációja receptoringerlést követően. Ezzel szemben a citoplazmai kalciumszint emelkedése receptoraktiváció létrejötte nélkül (akár a kalcium ionofór ionomycinnel, akár a petesejtekbe injektált inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) vagy pufferezt Ca^{2+} injektálásával) szintén a TRESK áram aktivációját eredményezte. A citoplazmai kalciumjel tehát a TRESK aktivációjának szükséges feltétele. Az áram kalciumjel általi aktivációja hosszan fenntartott, az áram lassan áll vissza a nyugalmi értékre (akár fél óráig is eltarthat), a citoplazmai kalciumszint azonban ennél lényegesen gyorsabban, 1-2 perc alatt visszatér a nyugalmi értékre. Ez arra utal, hogy a TRESK kalcium általi aktivációja egy közvetett hatás. Ennek megfelelően kitépett membránfoltokban nem változott a TRESK csatorna aktivitása kalcium hatására (115).

A csatorna aktivációjáért felelős jelátviteli utat munkacsoportunk farmakológiai megközelítéssel azonosította. Egy kalcium/kalmodulin-függő foszfatáz, a calcineurin gátlószerei (cyclosporin A, FK506) ugyanis megakadályozták a TRESK kalciumjel általi aktivációját. Konstitutívan aktív calcineurin és TRESK csatornát kódoló cRNS együttes injektálása vagy rekombináns calcineurin fehérje petesejtekbe történő injektálása kalciumjel hiányában is fokozta a TRESK áramot. A csatorna foszforiláció-függő szabályozásában a 276-os szerin a legfontosabb, ennek mutációi jelentősen csökkentik (de nem szüntetik meg teljesen) a kalciumjel általi aktivációt. A defoszforilált állapotot utánzó S276A mutáció alapárama jelentősen nagyobb, míg a foszforilált állapotot modellező S276E mutáns árama lényegesen kisebb, mint a vad típusú csatornáé. A Ser 276 hatásához hozzájárulnak közeli szomszédjai a Ser 274 és Ser 279 („Ser 276 klaszter”).

Ezen aminosavak mellett a Ser 264 is a foszfatáz célpontja. Ezek az aminosavak konzerváltak a humán TRESK esetén is (Ser 252, 262, 264 és 267).

A csatorna és a calcineurin kapcsolata azonban nem egyszerű enzim-szubsztrát kapcsolat. Ismert, hogy a calcineurin fontos szerepet tölt be az adaptív immunválaszban azáltal, hogy az egyes T-limfocitákban található NFAT (nuclear factor of activated T cells) nevű transzkripciósfaktort defoszforilálja és így aktiválja azt. Az NFAT két, jól konzervált calcineurinkötő motívummal rendelkezik, a PxIxIT és a LxVP motívumokkal (az x helyén bármely aminosav állhat). Az egér csatorna (PQIVID) és a humán TRESK (PQIIS és LQLP) intracelluláris hurokrégiójában is találhatóak az NFAT-éhoz hasonló calcineurin kötő motívumok. A calcineurin kötődése ezekhez a kötőhelyekhez kalciumfüggő folyamat, így a csatorna nem csupán szubsztrátja az enzimnek, hanem interakciós partnere is. A kötőhelyek mutációval való elrontása (egér esetén PQAVAD, illetve humán csatorna esetén PQAAAS és AQAP) megszünteti a csatorna kalcium általi aktivációját, tehát a calcineurin csatornához történő kötődése szükséges a kalciumjel általi aktivációhoz (121, 122).

A TRESK aktivációja tehát defoszforiláció útján jön létre, nyugalmi állapotba való visszatéréséhez a szabályozásban résztvevő szerinek újbóli foszforilációja szükséges. A Ser 264 aminosav foszforilációjáért a proteinkináz A (PKA) felelős (123). A Ser 276 klaszter foszforilációjáért a MARK (mikrotubulus affinitás reguláló kináz) kinázok felelősek, e kinázoknak a TRESK a jelenleg ismert egyetlen ioncsatorna célpontja (124).

A csatorna kalciumjel általi szabályozásánál meg kell említeni egy fajok közötti különbséget is. A humán TRESK csatorna áramát forbol észterrel (proteinkináz C aktivátorral) többszöröseire lehet aktiválni (125). Az egér csatorna esetén munkacsoportunk azonban már a TRESK csatornával kapcsolatos kutatások kezdetén leírta, hogy a proteinkináz C aktivációja nem befolyásolja a TRESK áramot (115). A PKC hatása nem közvetlen (a PKC konszenszus helyek mutációja nem befolyásolja az aktiváció létrejöttét), de nem is a calcineurin közvetíti (cyclosporin A előkezelés után is létrejön) (125). A humán TRESK PKC általi aktivációjának mechanizmusát munkacsoportunk azonosította, erről beszámoló kéziratunk pedig jelenleg elbírálás alatt áll.

2.3.4. Farmakológiai tulajdonságok

A többi K_{2P} csatornához hasonlóan a TRESK csatorna is érzéketlen több különböző klasszikus K^+ -csatorna gátlószerekre, mint például a 4-aminopiridin, a Cs^+ , az apamin vagy az ATP-függő káliumcsatornát gátló tolazamid, glipizid. A tetraetilammónium a humán ortológot kismértékben (kb. 30%-ban), az egér csatornát pedig egyáltalán nem gátolta (117, 114). A befelé rektifikáló K^+ -csatornák gátlószere, a Ba^{2+} magas (3 mM) koncentrációban gátolja a TRESK áramot. A Ba^{2+} általi gátlás feszültségfüggő (pozitív membránpotenciálok csökken a gátlás mértéke), ami arra utal, hogy az ion a plazmamembrán elektromos terén belül kötődik a csatornához (114). A kinin, kinidin és arachidonsav hatékonyan gátolják a TRESK áramot, ezek a szerek azonban számos egyéb ioncsatornára is hatnak, így nem használhatóak a TRESK azonosítására (117).

Az egér TRESK csatorna esetén leírták, hogy az extracelluláris acidózis gátolja a csatornát, az EC pH 6-ra való csökkentése körülbelül 50%-al csökkenti a TRESK áramot (117, 114). A pH-érzékenységet a TREK-1 és a TASK csatornához hasonló módon itt is az első pórusdoménhez közeli extracelluláris hurokban található hisztidin aminosav felelős. A humán TRESK csatorna megfelelő pozíciójában tirozin aminosav található, ennek megfelelően érzéketlen a pH változásaira (126). Ha az egér csatornában lecseréljük a hisztidint aszparaginra, a humán csatornában pedig a tirozint hisztidinre, pH-ra érzéketlen, illetve érzékeny csatornákat kapunk (118). A pH-érzékenység mechanizmusa így ismert, bár nem valószínű, hogy a csatorna élettani működésében szerepet játszik.

Az amidtípusú helyi érzéstelenítők számos K_{2P} csatorna működését, így a humán TRESK csatornát is befolyásolják. A vizsgált szerek közül a bupivakain bizonyult a legpotensebb ($IC_{50}=80 \mu M$) humán TRESK gátlószernek. A különböző szerekre kapott gátlás mértéke egér TRESK esetében hasonló volt, azonban a humán csatornához képest egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban is hatékonyak voltak (126, 127).

A benzokain (észtertípusú helyi érzéstelenítő) kapcsán érdekes megfigyelés volt, hogy az alapállapotban lévő egér csatornát magas (1 mM-os) koncentrációban is csak kb. 10-15%-ban, míg az előzetesen calcineurinnal aktivált csatornát jelentős mértékben (50%-ban) gátolta. A benzokain így heterológ rendszerekben használható a csatorna aktivációs állapotának meghatározására (121).

Az inhalációs anesztetikumokról ismert, hogy a TASK és TREK alcsaládok tagjainak áramát serkentik, míg a THIK alcsalád (Tandem Pore Domain Halothane-Inhibited K^+ Channel) a nevét arról kapta, hogy működésüket gátolja a halothane (78, 128). A TRESK áramot a halotán, szevoflurán, izoflurán és dezflurán serkenteni tudta, mindegyik vizsgált szer esetén a félmáximális hatékony koncentráció (EC_{50}) a klinikailag alkalmazott koncentrációtartományba esett. A vizsgált K_{2P} csatornák közül a TRESK bizonyult legérzékenyebbnek ezekre a szerekre, illetve a legnagyobb aktiváció is a TRESK esetén volt megfigyelhető (126, 127). Ennek ellenére TRESK génhiányos egérben az érzéstelenítéshez szükséges minimális alveoláris koncentráció egyáltalán nem, vagy csak kismértékben emelkedett (129). Ennek magyarázata lehet az, hogy a génhiányos állatban más receptorok, és csatornák (pl. a korábban tárgyalt TREK csatornák) teljes mértékben helyettesítik a TRESK funkcióját.

Az eddig ismertetett farmakonok a TRESK-en kívül más K_{2P} csatornákra is hatnak. A csatorna áramának natív sejtekben való azonosításához olyan szerekre lenne szükség, amelyek a K_{2P} alcsaládon belül alkalmasak lehetnek a TRESK elkülönítésére. Ezért munkacsoportunk korábban több száz anyagot tesztelt *Xenopus* petesejtekben kifejezett egér TRESK csatornákon és így sikerült azonosítani a cink- és higanyionokat, mint a TRESK csatorna hatékony gátlószereit (130). Az EC pH-hoz hasonlóan a cinkion nem hatott a humán TRESK csatornára. Mutációs vizsgálatokkal sikerült igazolni, hogy a cinkion gátló hatásáért a csak az egér csatornában található EC hisztidin felelős. A cinkion a többi egér K_{2P} csatorna közül a TRAAK és TASK-3 csatornát kismértékben gátolta, a többi csatornát aktiválta vagy kismértékben serkentette. A TASK-3 és TRAAK viszont RR-re érzékeny, míg a TRESK érzéketlen a polikationos festékre, így a két gátlószer kombinált felhasználásával azonosítható az egér TRESK áram. A higany lassan, de irreverzibilisen gátolja mind az egér, mind a humán TRESK csatornát, a többi K_{2P} csatornára viszont vagy nem hat, vagy kismértékben aktiválja azok áramát, így elvileg alkalmas lenne a TRESK áram kimutatására natív sejtekben.

A gyakorlatban azonban nem terjedt el egyik gátlószer sem, részben a nehézkés felhasználásuk, részben mérgező voltak miatt.

A klinikumban antidepresszánsként jól ismert sipatrigin, illetve fluoxetin gátolják a TRESK áramot, viszont hatással vannak a TREK csatornára is. A sipatrigin egyik származéka, a lamotrigin viszont csak a TRESK-re hatott, a TREK csatornákra nem (21, 98, 131, 3). A lamotrigine specificitását szélesebb körben nem vizsgálták. A feszültségfüggő kalciumcsatorna gátlószer verapamil is gátolja a TRESK áramot (132).

Több növényi anyagról is igazolódott, hogy gátolják a TRESK csatorna működését, mint például a szecsuáni bors jellegzetes bizsergő érzéséért felelős α -hidroxi-sanshool, illetve az *Aristolochiaceae* (farkasalmafélék) családba tartozó növényekből kivonható arisztolsav (133, 92). Ezek a szerek azonban más ioncsatornákra, illetve egyéb K_{2P} csatornákra is gátló hatást fejtenek ki.

A TRESK csatornára ható modulátorokat nagy áteresztőképességű vizsgálatok során is kerestek. Egy ilyen vizsgálat során a hisztaminreceptor-antagonista loratadin a csatorna hatékony gátlószerének bizonyult (134). Mutációs vizsgálatokkal igazolták, hogy a loratadin kötésében olyan, a transzmembrán szakaszokban található fenilalanin aminosavak játszanak szerepet, amik a lidocaine kötésében is szerepet játszanak (135). A loratadine hatását azonban a TASK-3 kivételével más K_{2P} csatornákon nem vizsgálták. Egy másik vizsgálat során pedig az antiamóbas szer cloxyquin azonosították, mint a csatorna hatékony ($3 \mu\text{M}$ körüli EC_{50}) aktivátorát (136). A cloxyquin szelektivitását részletesen nem vizsgálták, a szer hatásmechanizmusa vizsgálatainkat megelőzően tisztázatlan volt. A TREK és TRESK csatornákra ható szereket az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat A TREK és TRESK csatornákra ható szerek

(Az adott szer hatása a csatornára: ↑: aktiváló hatás, ↓: gátló hatás, -: Nem befolyásolja az adott csatorna áramát, NA: nincs adat)

	TREK-1	TREK-2	TRAAK	TRESK
Illékony anesztetikumok	↑	↑	↑	↑
Riluzol	↑/↓	-	↑	-
Lidokain, Benzokain	↓	↓	↓	↓
Fluoxetin	↓	↓	NA	↓
Citalopram	↓	↓	NA	↓
Klórpromazin	↓	↓	-	↓
Haloperidol	↓	↓	-	NA
Sipatrigin	↓	↓	↓	↓
Lamotrigin	-	-	-	↓
Ruténiumvörös	-	↓	↓	-
Spadin	↓	-	-	-
Zn ²⁺	-	-	↓	↓
Hg ²⁺	-	-	-	↓

2.3.5. Élettani, kórélettani jelentőség

A TRESK legnagyobb mennyiségben a primer érző idegsejtekben fejeződik ki, ezért feltételezhető, hogy részt vesz az érző idegi működés szabályozásában. A csatorna mRNS-ének mennyisége csökken több fájdalommodellben, például a neuropátiás fájdalom állatmodelljében (*in vivo* axotómia) vagy tumoros áttétek okozta fájdalom modelljében úgy, hogy közben az egyéb K_{2P} csatornák mennyisége nem változott (3, 137). E modellekben a TRESK csatorna csökkent kifejeződése a fájdalom érzékelésében kulcsszerepet játszó kis és közepes méretű DRG idegsejtek fokozott ingerlékenységéhez vezetett, aminek hatására az állatok fokozott érzékenységgel reagáltak mechanikai ingerekre (mechanikus allodynia alakult ki). Hasonló fenotípus volt megfigyelhető akkor is, ha a TRESK csatorna mennyiségét siRNS kezeléssel (intrathecalisan adva) csökkentették. A DRG idegsejtek fokozott ingerlékenységéről két, egymástól független TRESK génhányos egértörzs esetén is beszámoltak (129, 118). A csatorna hiánya azonban nem vezetett súlyos *in vivo* fenotípushoz, ami utalhat arra, hogy a TRESK gén veleszületett hiányát más csatorna, esetleg csatornák fokozott kifejeződése kompenzálhatja.

A TRESK csatorna mennyiségének átmeneti fokozódása izolált DRG és TG idegsejtekben a membránpotenciál hiperpolarizációjához és a sejtek ingerlékenységének csökkenéséhez vezetett (138, 139). A csatorna expressziójának fokozódása (TRESK-et kifejező adenovírus intrathecalis injekciójával) több modellben is helyreállította a TRESK expresszióját, valamint megakadályozta a fokozott érzékenység kialakulását (3, 137).

Ismert, hogy a lakosság 10-15%-át érintő migrén kialakulásában szerepet játszhatnak olyan ioncsatorna mutációk is, amelyek a TG idegsejtek fokozott ingerlékenységéhez vezetnek (140). Egy 110 beteget érintő genetikai vizsgálatban azonosítottak egy leolvasásikeret-eltolódást okozó („frame-shift”) TRESK mutációt egy migrénes családban, ami kizárólag a család migrénben szenvedő tagjaiban volt jelen (141). Ez a mutáció (F139WfsX24) két bázispár delécióját jelenti, aminek eredményeképpen az mRNS-en korai stop kodon jön létre. A keletkező csonka TRESK fehérje nem képez működőképes csatornát, a vad típusú csatornával viszont dimert alkot. *Xenopus* petesejtekben a mutáns csatorna domináns negatív hatást fejtett ki a vad típusú TRESK áramra. A domináns negatív hatás izolált trigeminális ganglion idegsejtekben is létrejön, a mutációt tartalmazó TRESK fokozott kifejeződése növelte az idegsejtek ingerlékenységét (142). Az F139WfsX24 mutáció leírása után azonban számos migrénes beteg genetikai vizsgálata nem azonosított újabb migrént okozó TRESK mutációt, annak ellenére, hogy leírásra került egy TRESK csatornát érintő, domináns negatív hatású mutáció is (C110R). Ez a mutáció viszont migrénes betegekben és egészséges kohortban egyaránt kimutatható volt (143). A C110R mutáns csatorna kifejezése izolált TG idegsejtekben meglepő módon nem fokozta az idegsejtek ingerlékenységét, annak ellenére, hogy a *Xenopus* petesejtekben kifejezett TRESK csatornák esetén domináns negatív hatást fejtett ki (143, 144). A TRESK gén gyakori polimorfizmusai nem mutattak összefüggést migrénes fenotípussal két egymástól független tanulmányban (145, 146) sem. Egy 29 genom szintű asszociációs tanulmányt (Genome-wide association studies, GWAS) feldolgozó metaanalízis sem igazolta, hogy a TRESK gén migrénre hajlamosító gén lenne (147). Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a TRESK csatorna mutációi nem játszanak szerepet a migrén gyakori formáinak kialakulásában, viszont nem zárják ki annak a lehetőségét sem, hogy a csatornát aktiváló szerek terápiás értékűek lehetnek migrénben.

A TRESK nemcsak az érző idegrendszer, hanem az autonóm idegrendszer működésében is szerepet játszik. A ggl. nodosumban kimutatható a csatorna jelenléte egyedi csatorna mérésekkel (148). A TRESK csatorna mennyisége a ggl. nodosumban emelkedett volt a cukorbetegség két különböző patkánymodelljében, ami az idegsejtek hiperpolarizációjához, csökkent ingerlékenységéhez és a gyomor-bél rendszer működésében fontos vago-vagális reflexek károsodásához vezetett. A TRESK csatorna siRNS-el való csendesítése esetén ezek az elváltozások nem jelentek meg a cukorbeteg állatokban (149).

2.4. K_{2P} csatorna alegységek heterodimerizációja, ennek jelentősége

A heteromerizáció szerepe az ioncsatornák funkciójának kialakításában más ioncsatornák esetén (pl. TRP csatornák és ionotróp glutamát receptorok) jól ismert (150, 151). A keletkező heteromerek tulajdonságaikban eltérnek a homomer csatornáktól. Ezen eltérő tulajdonságú csatornák lehetővé teszik az áram tulajdonságainak az adott sejtben betöltött funkcióra való optimalizálását, „finomra hangolását”. A különböző káliumáramokért felelős csatorna-alegységek azonosítása után a heteromerizáció lehetősége felmerült a káliumcsatornák esetében is. A K_v és K_{ir} csatornák esetében általánosan elterjedt jelenség a heteromerizáció (152). Egyes K_v és K_{ir} alegységek (pl. a $K_v8.1$) homomerként nem képeznek működőképes csatornát, más alegységekkel új tulajdonságokkal rendelkező heteromert képezve viszont fontos élettani szerepet töltenek be, a heteromer csatorna hiánya pedig betegségeket okoz (153-155). Egy adott heteromer csatorna tulajdonságait koexpressziós kísérletekkel azonban nem lehet pontosan megállapítani, ugyanis nem tudjuk, hogy az együttes kifejeződés során milyen arányban képződnek a különböző alegységtartalmú homo- és heteromerek. Ezt a problémát úgy lehet kiküszöbölni, ha molekuláris biológiai módszerekkel olyan fehérjét készítünk, ahol több alegység van egymáshoz kapcsolva. A K_v csatornák esetében ez a megközelítés a 6TMS/1P membrántopológia miatt nehezen alkalmazható. A K_{ir} és K_{2P} csatornák esetében ezekkel a “tandem” csatornákkal jól modellezhetőek a heteromer csatornák.

Az első K_{2P} alegységek klónozása után felmerült a lehetőség, hogy az eltérő K_{2P} alegységek az egyéb K^+ -csatorna alegységekhez hasonlóan nemcsak homomer, hanem heteromer csatornákat is képezzenek. A K_{2P} csatornák dimereket képezve működőképesek. A plazmamembrán lokalizációjú, azonban önmagában nem funkcióképes TASK-5 és KCNK6 alegységekről felmerült, hogy a homomerként nem funkcionális K_v alegységekhez hasonlóan más alegységekkel heteromerizálva megváltoztatják azok tulajdonságait. Ezek az alegységek azonban nem befolyásolták más, közeli rokon alegységek áramának tulajdonságait (TASK-5 esetén a TASK-1 alegység áramának nagyságát és pH-érzékenységét, KCNK6 esetén pedig a KCNK7, illetve TWIK-1 alegységekkel kifejezve sem eredményezett mérhető háttér káliumáramot), így az első eredmények alapján úgy tűnt, a K_{2P} -alcsaládra nem jellemző a heteromerizáció.

2.4.1. A TASK-1 és TASK-3 funkcionális heterodimert képeznek

A K_{2P} alcsaládban azonban mégis előfordul heteromerizáció, az első heterodimer csatornát munkacsoportunk írta le. Heterológ expressziós rendszerben (*Xenopus* petesejt) kifejezett TASK-1 és TASK-3 csatornák pH- és RR-érzékenysége eltérő; a TASK-1 érzékenyebb a fiziológias tartományban történő pH-csökkenésre, viszont érzéketlen RR-re, ezzel szemben a TASK-3 kevésbé érzékeny a pH változásaira, míg a RR hatékonyan gátolja áramát. A TASK-1 és TASK-3 együttes kifejezése esetén olyan áramot kapunk, aminek pH- és RR-érzékenysége nem magyarázható homomerek különböző arányú képződésével, tehát a két alegység heterodimert képez (156). A két alegység mesterséges összekapcsolásával pontosan meghatározhatóak a TASK-1/TASK-3 heterodimer tulajdonságai. A heterodimer több tulajdonsága (pH-érzékenység, G_q -fehérje kapcsolt receptor ingerlése általi gátlás, inhalációs anesztetikumok általi aktiváció) a két homodimer csatorna „átlagának” felel meg, más tulajdonságait (pl. RR-érzékenységét) viszont kizárólag az egyik alegységtől (ebben az esetben a TASK-3-tól) „öröklí” (157, 156). Ha egy szövetben keletkezik heterodimer TASK-1/TASK-3 csatorna, a nyugalmi membránpotenciál pH és receptoringerlés által finomabban szabályozható. A heterodimer keletkezését heterológ rendszerekben más kutatócsoportok is megerősítették, valamint jellemezték a homo- és heterodimer csatornák egyedi csatorna tulajdonságait is (157-160). A TASK-1/TASK-3 heterodimer keletkezését számos natív szövetben igazolták, például kisagyi szemcsesejtekben (158), motoneuronokban (157, 161), illetve a hippocampus interneuronjaiban, valamint thalamocorticalis reléneuronokban is (162, 163). A központi idegrendszeren kívül is azonosították a heterodimert, például pitvari szívizomsejtekben (164) és a glomus caroticumban is, ahol szerepet játszik a hypoxia érzékelésében (159).

2.4.2. A TWIK-1 alegység többféle alegységgel állhat össze

Az emlős K_{2P} csatornák közül a TWIK-1 alegységet azonosították elsőként, jellemzése azonban nehézségekbe ütközött, ugyanis a csatorna rosszul fejeződik ki heterológ rendszerekben (165, 166).

Az alacsony kifejeződés háttérében egyes eredmények szerint a csatorna posztranszlációs módosítások (Small ubiquitin-like modifier, SUMO fehérjék általi konjugáció, SUMO-iláció) általi gátlása (167, 166), más vizsgálatok szerint viszont a csatorna fokozott endocitózisa áll (168, 169). A csatorna gyenge plazmamembránbeli kifejeződése felvetette annak a lehetőségét, hogy a TWIK-1 esetleg más alegységekkel kapcsolódva heterodimerként jut ki a plazmamembránba.

Patkány kiagyi szemcsesejtekben végzett kísérletek alapján a TWIK-1 mind a TASK-1, mind a TASK-3 alegységgel dimerizálódhat. A TWIK-1/TASK heteromer csatorna keletkezését heterológ rendszerekben energiatranszfer módszerrel végzett mérések, koimmunoprecipitációval és domináns negatív hatású TWIK-1 mutánsal végzett elektrofiziológiai kísérletek is igazolták. A heterodimerben található TWIK-1 alegység érzékenyvé teszi a csatornát a SUMO-iláció általi gátlásra. Ha a pipettaoldat tartalmazott SUMO-t lehasító enzimet, nőtt a heterodimert kifejező kisagyi szemcsesejtek háttér káliumárama, illetve hiperpolarizálódott a membránpotenciál. Ebből tehát következik, hogy a sejt SUMO-ilációs állapotának változása (pl. oxidatív stressz esetén) a heterodimer csatorna aktivitásán keresztül befolyásolja a szemcsesejtek nyugalmi membránpotenciálját (165).

A TASK és TWIK-1 alegységek összeépülését vizsgáló tanulmányban a TREK-1 alegység és TWIK-1 között nem tudtak interakciót kimutatni, negatív kontrollként használták fel a heterológ rendszerekben végzett kísérletek esetén. Egy másik kutatócsoport azonban a két alegység heteromerizációjáról számolt be COS-7 sejtekben, a két alegység összeépülését elektrofiziológiai, energiatranszfer és biokémiai módszerekkel is igazolták. A TREK-1/TWIK-1 heterodimer jelenlétét hippocampális asztroglia sejtekben is igazolták, bármelyik alegység szintjének csökkenése csökkentette a mért káliumáram nagyságát. Ugyanebben a közleményben arról a váratlan eredményről számolnak be, hogy a TREK-1/TWIK-1 heterodimer permeabilitási tulajdonságai megváltoznak $G_{\beta\gamma}$ -fehérje kötés hatására és a csatorna áteresztővé válik a nagyméretű glutamát anion számára (170). A szelektivitási filter ilyen fokú megváltozása nagyon váratlan, a jelenséget a pórus dilatációjával magyarázzák, ehhez hasonló jelenség ismert a TRPV1 csatorna esetén (171). A TREK-1/TWIK-1 heterodimer létezését más kutatócsoportok azonban nem tudták megerősíteni (172, 173).

2.4.3. A THIK-1 és THIK-2 heterodimert képeznek

A THIK alegységek nevüket arról kapták, hogy más K_{2P} csatornákkal szemben a halothane nevű inhalációs anesztetikum nem serkenti, hanem gátolja a működésüket. A THIK-1 alegység *Xenopus* petesejtekben jól kifejezhető. THIK-2 RNS injektálása esetén azonban az alegység első leírói nem kaptak káliumáramot, ezért a csatornát a „néma” K_{2P} alegységek közé sorolták (128). A THIK-2 azonban mégis alkothat működőképes csatornákat a plazmamembránban.

Több kutatócsoport közel egyidőben mutatta ki, hogy a csatorna N-terminálisának deléciója, vagy az ott található endoplazmás retikulum retenciós szignál mutációja működőképes THIK-2 csatornát eredményez (174, 175). A THIK-2 plazmamembránba való kijutásához tehát szükséges valami további, eddig nem ismert tényező, ami ellensúlyozni tudja ezt a retenciós szignált.

A THIK-1 és THIK-2 alegységek között energiatranszfer és biokémiai módszerekkel kapcsolat mutatható ki (176). A két alegység heteromerizációja elektrofiziológiai vizsgálatokkal is igazolódott, illetve ismert a THIK-1/THIK-2 heterodimer vezetőképessége is (THIK-1: 5 pS, THIK-2: 2,5 pS, heteromer: 3,5 pS). Bár a heteromer képződése natív sejtekben jelenleg még nem igazolt, a heteromerizáció feltételei adottak, hiszen a két alegység együtt van jelen a hippocampus, valamint a vesetubulusok egyes sejtjeiben (128, 177)

3. Célkitűzések

1. A K_{2P} alcsaládon belül több alegységről is ismert, hogy heterodimerizáció révén olyan csatornákat képeznek, melyek az őket alkotó alegységek homodimer csatornáitól eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. A TREK-1 és TREK-2 egymáshoz közeli rokon csatornák, kifejeződési mintázatuk átfed a szervezetben, viszont több tulajdonságukban (pl. gátlószeres érzékenység, egyedi csatorna vezetőképesség) eltérnek egymásól. Elképzelhető, hogy a két alegység működőképes heterodimert képezzen. Célunk egy esetleges működőképes TREK-1/TREK-2 heterodimer kimutatása, jellemzése majd a heterodimerizáció bizonyítása heterológ expressziós rendszerekben, illetve primer sejtekben is.

2. Egy nagy áteresztőképességű vizsgálat TRESK aktivátorként azonosította a korábban antiámóbas szerként használt cloxyquin vegyületet. A cloxyquin szelektivitása és hatásmechanizmusa azonban nem ismert. Ha a cloxyquin szelektív aktivátora a TRESK csatornának, segítségével azonosítható a TRESK áram natív sejtekben és esetleg új TRESK modulátorok kiindulási vegyülete lehet. A szelektivitás, valamint a hatásmechanizmus kérdését tisztázni szerettük volna *Xenopus* petesejtekben kifejezett K_{2P} csatornákon, felhasználva munkacsoportunk jártasságát a K_{2P} csatornák farmakológiájának, valamint a TRESK csatorna szabályozásának vizsgálatában.

3. Ha a cloxyquin megfelelően szelektív, elképzelhető, hogy kémiaiilag módosított származékai szintén befolyásolni tudják a TRESK működését. A Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézete (Prof. Mátyus Péter és munkatársai) által előállított cloxyquin származékok hatásait *Xenopus* petesejtekben kifejezett K_{2P} csatornákon, valamint izolált idegsejteken terveztük vizsgálni.

4. Módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

A kísérletek során felhasznált analitikai tisztaságú vegyszereket a Sigma (St. Louis, MO, USA), Fluka (Milwaukee, WI, USA) és Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) cégektől vásároltuk. A molekuláris biológiai munkák során felhasznált enzimeket a Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) és New England Biolabs (Beverly, MA, USA) cégektől vettük. Az *in vitro* irányított mutagenézishez használt készletet a Stratagene (La Jolla, CA, USA) cégtől szereztük be. *In vitro* cRNS szintézishez az Ambion (Austin, TX, USA) cég készletét használtuk. A sortilin-származék neuropeptidet, a spadint az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport szintetizálta számunkra. A peptidet desztillált vízben oldottuk fel, majd 1 mM-os törzsoldat formájában -20 °C-on tároltuk. A ruténium vöröst (ruthenium red, RR) a Sigmatól szereztük be és 0,1 M ammonium-acetátban oldottuk fel, majd felhasználásig 10 mM-os törzsoldatként, -20 °C-on tároltuk. A cloxyquin a Sigma cégtől szereztük be, alkoholban oldottuk fel és 100 mM-os törzsoldatát -20 °C-on tároltuk. A benzocaine szintén a Sigma terméke volt, alkoholban oldottuk fel és 30 mg/ml-es oldat formájában tároltuk. Az ionomycint calcium só formájában szereztük be az Enzo Life Sciences cégtől (Farmington, NY, USA), DMSO-ban oldottuk fel és 5 mM-os törzsoldatként -20 °C-on tároltuk. A különböző cloxyquin származékokat a Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézete állította elő számunkra, felhasználásig 100 mM-os alkoholos törzsoldatként -20 °C-on tároltuk őket.

4.2. Molekuláris biológia

A kísérletek során használt egér TWIK-2, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TREK-2, TALK-1, THIK-1 és TRESK (mTRESK) csatornákat, valamint a humán TRESK (hTRESK) csatornát laboratóriumunk korábban klónozták (130, 115). Az egér TREK-1-et és TRAAK-ot kódoló plazmidokat Prof. Michel Lazdunski és Dr. Florian Lesage, a humán K_v1.3 csatornát kódoló plazmidot pedig Prof. Panyi György bocsátotta rendelkezésünkre.

A kísérletek során használt mutáns csatornákat PCR-alapú mutagenézissel állítottuk elő a gyártó utasításai szerint. Az általam felhasznált mutáns egér és humán TRESK csatornák egy részét (mTRESK S276A, PQAVAD, hTRESK S264A, PQAAAS) laboratóriumunk korábban hozta létre (121, 122, 115). A TREK-2/TREK-1 tandem konstrukciót PCR alapú klónozással hoztuk létre. A TREK-2 alegység STOP kodonját, valamint a TREK-1 alegység START kodonját *MunI* restriktációs enzimhelyre cseréltük le. Így tehát egy polipeptid lánc két különböző alegységet kódol, amiket 2 aminosav (glutamát és leucin) köt össze. Az egyedi csatornás mérések során használt TREK-2-S/TREK-1-L konstrukciót hasonló stratégiával hoztuk létre, csak templátként a mutáns alegységeket használtuk fel a vad típusú csatornák helyett. A Western blot kísérletekhez használt epitóppal megjelölt alegységeket (V5-TREK-1-L és TREK-2-L-FLAG) szintén PCR alapú klónozással hoztuk létre.

A TREK-1 és TREK-2 alegységek emlős sejtekben való kifejezéséhez a TREK-1 és TREK-2 csatornákat pcDNA3.1 vektorba klónoztuk át. A két alegység együttes kifejeződését emlős sejtekben úgy oldottuk meg, hogy a két alegységet egy virális szekvenciával, a T2A-val kapcsoltuk össze (TREK-1-T2A-TREK-2). A T2A-szekvencia a transzláció során önmagát elhasítja, így a szekvencia által összekapcsolt fehérjék (esetünkben a TREK-1 és TREK-2 alegység) 1:1 arányban fog kifejeződni a plazmidot felvevő sejtekben (178, 179) Használat előtt minden elkészült konstrukció hűségét automata szekvenálással ellenőriztük le (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

A különböző csatornák *Xenopus* petesejtekben való kifejezéséhez az adott csatornát kódoló DNS szakaszt a pXEN *Xenopus* expressziós vektorba klónoztuk át, vagy eleve ebben a vektorban hoztuk létre a konstrukciót. A templátként szolgáló plazmidokat restriktációs endonukleázzal linearizáltuk (a kódoló régiót követően), majd proteináz-K kezeléssel RNáz mentessé tettük a mintákat. A cRNS szintézist a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A szintézis után az RNS-t denaturáló, formaldehid tartalmú agaróz gélen megfutattuk, így ellenőrizni tudtuk az RNS épségét, valamint mennyiségéről is kaptunk információt. Az RNS mennyiségét spektrofotometriás módszerrel számszerűsíteni is tudtuk.

4.3. Petesejtek preparálása, injektálása

Az összes, élő állatot igénybe vevő kísérleti protokollt jóváhagyta a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi és Etikai Bizottsága. A kísérleteket az engedélyben (XIV-I-001/2154-4/2012) leírtak szerint, valamint az egyéb intézményi és törvényi szabályozást betartva végeztük el. Az afrikai karmosbékákat (*Xenopus laevis*) a szokásos módon (50 l-es tartályokban, folyamatosan cserélődő, megfelelően szűrt vízben, 19 °C-os helyiségekben) tartottuk.

A békákat benzocaine fürdővel (0,03%) érzéstelenítettük, majd sebési úton petefészeklebeenyeket távolítottunk el. Ezeket (névleg) Ca^{2+} -mentes, hipozmotikus oldatba helyeztük (OR2, összetétele mM-ban: NaCl 82,5, KCl 2, MgCl_2 , HEPES 5, pH 7,5 NaOH-al) és 1-es típusú kollagenázzal (1,45 mg/ml, 148 U/mg, type I; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA), lassan forgatva emésztettük 20, majd 15 percig (közben oldatot cserélve). Tíz perc gyors forgatás után többször átöblítettük a szövetlebeenyeket OR2 oldattal. A kezelés a kötőszövet, valamint a tüszős réteg fellazulásához vezetett, ezt követően a kb. 1-1,3 mm átmérőjű sejtekről (ez a mérettartomány az elektrofiziológiában általában használt V-VI. érési stádiumnak felel meg) manuálisan (finom csipesz segítségével) eltávolítottuk a maradék follikuláris réteget. A sejteket ezt követően mind az injektálásig, mind a felhasználásig 18 °C-on billegtetve tároltuk módosított Barth's oldatban (MBK). Ennek összetétele (mM-ban): NaCl 88; KCl 1; NaHCO_3 2,4; MgSO_4 0,82; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,33; CaCl_2 0,41; HEPES 20 (pH 7,5; NaOH); ezt az oldatot az alábbiakkal egészítettük ki: Na-piruvát 4,5 mM, teofillin 0,5 mM, penicillin (100 U/ml) és streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A petesejteket preparálás után 1 nappal üvegkapillárison keresztül, a Nanoliter Injector (World Precision Instruments, Sarasota, FL) segítségével injektáltuk az állati póluson 50 nl cRNS-el. A kételektródos voltage clamp mérésekhez, valamint a membránpreparáláshoz 2-6 ng RNS-t injektáltunk petesejtenként, míg az egycsatornás mérésekhez petesejtenként 0,025-0,5 ng RNS-t injektáltunk (csatornatípustól függően). A petesejteken az MBK oldatot naponta cseréltük.

4.4. Emlős sejtvonalak tenyésztése, tranziens transzfekció

A kísérletekhez felhasznált humán embrionális vese (HEK293T) sejtvonalat az ATCC cégtől (Manassas, VA) szereztük be. Ez a sejtvonal gyorsan osztódik és könnyen fenntartható. Ezen kívül előnye még, hogy hatékonyan transzfektálható, a transzfektált sejtek pedig nagy mennyiségben fejezik ki a felvett plazmid által kódolt fehérjéket.

A HEK293T sejtek és a DRG neuronok tenyésztéséhez használt műanyag flaskákat és 35 mm-es sejtenyésztő edényeket a Greiner Bio-One GmbH cégtől (Kremsmuenster, Ausztria), a sejtenyésztéshez használt Dulbecco's Modified Eagle's médiumot (DMEM) és a főtális borjú szérumot (FBS) a Lonza cégtől (Basel, Svájc) vásároltuk. A tranziens transzfekcióhoz használt tápoldatot (csökkentett szérumtartalmú Minium Essential Medium (MEM), "Opti-MEM"), valamint a transzfekciós reagenst (Lipofectamine 2000) az Invitrogen™ Life Technologies-tól (Carlsbad, CA, USA) szereztük be.

A HEK293T sejteket 100 U/ml penicillinnel és 0,1 mg/ml streptomycinnel kiegészített, valamint 10% FBS-t tartalmazó DMEM tápfolyadékban tartottuk fenn 75 cm² alapterületű szövettenyésztő flaskákban. Tranziens transzfekció előtt 24 órával 35 mm-es sejtenyésztő edényekbe sejteket osztottunk a sejteket (20-50.000 sejt/ edény). A transzfekció napján a sejtek tápoldatát 2 ml Opti-MEM-re cseréltük, majd Lipofectamine 2000-el, a gyártó előírásai szerint transzfektáltuk a sejteket (csatornatípustól függően 1-2,5 µg DNS, 2 µl reagens 35 mm-es edényenként). Hat óra elteltével visszacseréltük a tápoldatot DMEM-re. A kísérleteket a transzfekciót követő 24-48 órában végeztük. A transzfekcióhoz használt DNS keverék minden esetben tartalmazott olyan plazmidot, ami a CD8 sejtfelszíni fehérjét kódolta. A sejtekhez ugyanis anti-CD8 antitesthez kapcsolt gyöngyöket (Dynabeads anti-CD8, Thermo Fisher Scientific) adtunk hozzá mérés előtt. A transzfektált sejtek membránján megtalálható a CD8 fehérje, így a gyöngyökkel megjelölt sejteket használtuk fel az elektrofiziológiai mérésekhez.

4.5. Egér hátsó gyöki ganglionok preparálása, izolált idegsejttenyészet létrehozása

A kísérletek során használt vad típusú, illetve TRESK génihiányos FVB/Ant típusú egereket az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetéből szereztük be. Az egereket napi 12 órás megvilágítás és *ad libitum* ivóvíz- és táplálék-hozzáférés mellett tartottuk. A 3 hónapos egereket szén-dioxid belélegeztetéssel altattuk túl. Ezt követően a háti és ágyéki szakasz gerincvelői érződúcaikat kipreparáltuk, majd 4 °C-os PBS-be (összetétele mM-ban: 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 NaH₂PO₄, pH 7,4 NaOH-al) tettük őket. A PBS-t kiegészítettük 2 mg/ml 1-es típusú kollagenázzal és finom keverés mellett fél óráig 37 °C-on emésztettük a ganglionokat. A részlegesen emésztett dúcokat ezt követően 1,5 ml 100 U/ml penicillinnel, 0,1 mg/ml streptomycinnel és 10% FBS-el kiegészített sejttenyésztő folyadékba (DMEM-be) helyeztük és óvatosan 10-15-ször triturráltuk a sejteket levágott végű műanyag 1 ml-es pipettahegy segítségével. Ez a sejteket kiszabadítja szöveti környezetükből és így lehetővé válik az izolált idegsejttenyészet létrehozása. A sejt- és kötőszöveti mátrix törmeléktől úgy szabadultunk meg, hogy a sejtszuspenziót kiegészítettük 10 ml-re tápfolyadékkal, lecentrifugáltuk a mintát (1200 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet), majd a felülúszó óvatos eltávolítása után DMEM-ben reszuszendáltuk a sejteket, majd a DRG neuronokból (valamint gliasejtekből) álló sejtszuspenziót 35mm átmérőjű, poli-L-lizinnel előkezelt sejttenyésztő edények közepére cseppentettük. A sejteket 37 °C-on, 95% levegőt és 5% CO₂-t tartalmazó gázelegyben termosztáltuk. Minimum 2 óra eltelte után töltöttük csak fel az edényeket 2 ml tápoldattal, így biztosítva a sejtek megfelelő letapadását. A sejteket felhasználásig CO₂ termosztátban tartottuk. A preparálástól számított 48 órán belül mértünk a sejteken.

4.6. Két-elektrodos voltage clamp mérések

A *Xenopus* petesejtek sejtthártyáján átfolyó áramot a cRNS injektálás után 2-3 nappal mértük két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) technikával, OC-725C erősítő (Warner Instrument Corp., Hamden, CT) felhasználásával.

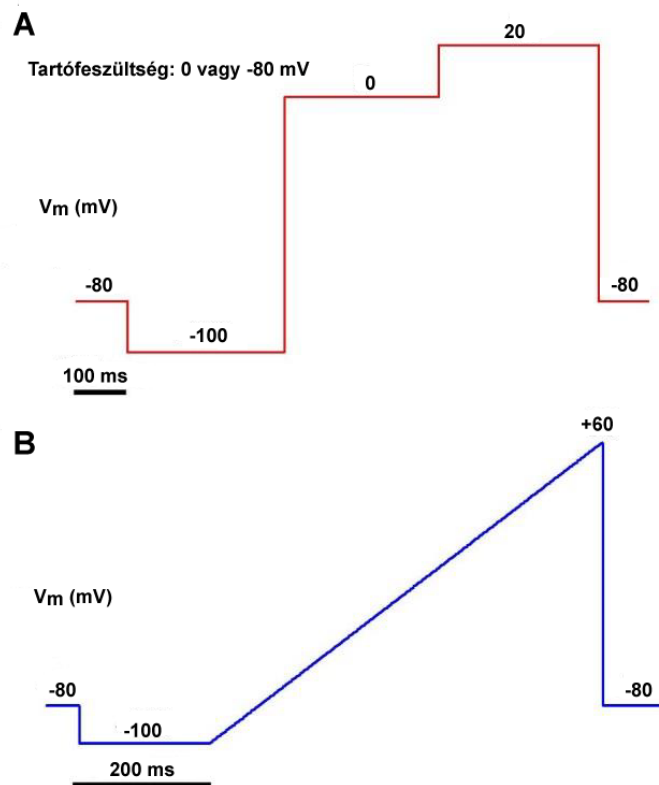
A két-elektrodos voltage clamp technikának az a lényege, hogy a petesejt membránpotenciálját egy megadott protokoll szerint változtatjuk és ezzel párhuzamosan mérjük a sejtmembránon átfolyó áram nagyságát. A két-elektrodos voltage clamp mérések során használt protokollt az 5. ábra szemlélteti. A feszültséglépéseket 4 másodpercenként ismételtük, a feszültséglépcsők között a sejt membránpotenciálját állandó értéken tartottuk. A tartófeszültség értéke a TREK csatornák esetén -75 mV, minden más csatorna esetében 0 mV volt. A mérésekhez az intracelluláris elektródokat boroszilikát üvegből (BF120-94-10, Sutter Instruments) húztuk (P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument Co., Novato, CA) úgy, hogy 3 M KCl oldattal megtöltve ellenállásuk 0,3-1 M Ω közé essen. A mérési adatokat 1 kHz-en szűrtük, majd 2,5 kHz-en digitalizáltuk Digidata Interface 1200 (Axon Instruments, Foster City, CA) analóg-digitális átalakítóval. A digitalizált adatokat a pCLAMP10.1 program (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) segítségével rögzítettük és értékeltük. A méréseket szobahőmérsékleten (21 °C) végeztük. Hidrosztatikai nyomáskülönbségen alapú perfúziós rendszer segítségével folyamatosan cseréltük az EC oldatot a sejt körül.

Az EC oldat összetétele a következő (mM-ban): NaCl 95,4, KCl 2, CaCl₂ 1,8, HEPES 5 (pH 7,5 NaOH-al). A magas K⁺-tartalmú EC oldat TREK csatornák esetén 40 mM KCl-ot, a többi csatorna esetén 80 mM KCl-ot tartalmazott, minden oldat esetén állandó a NaCl és a KCl koncentrációjának összege (az elektrofiziológiai kísérletekben használt oldatokat az 2. táblázat foglalja össze). Magas [K⁺] oldat esetén -100 mV-on nagy befelé irányuló K⁺-áramot várunk. Ezzel szemben alacsony [K⁺] oldatban a -100 mV-os feszültséglépések végén nem mérhető befelé irányuló K⁺-áram, az ilyen körülmények között mért áram egy nem specifikus szivárgó áram. A háttér káliumáram nagyságát úgy kapjuk meg, ha a magas [K⁺]-ban mért áram értékekből kivonjuk az alacsony [K⁺] mért értéket. Abban az esetben, ha a petesejteket nem, vagy desztillált vízzel injektáljuk, endogén káliumáramokat lehet mérni. Az endogén káliumáram 1 nagyságrenddel kisebb (kb. 100 nA), mint amit a csatorna cRNS-el injektált sejtek esetén mérhetünk (minimum 1-2 μ A). Ha a mérések során a 7,5-ös pH-tól eltérő pH-jú oldatot használtunk, az eltérő pH-ra a mérés napján, NaOH-al állítottuk be az oldatot. A felhasznált farmakológiai eszközöket mindig a mérés napján oldottuk fel a mérőoldatban.

4.7. Teljes-sejt (whole cell) patch clamp mérések

HEK293T sejteken, valamint DRG neuronokon is végzetünk méréseket teljes-sejt (whole-cell) patch clamp technikával, feszültségzár üzemmódban. Ekkor a két-elektrodos voltage clamp technikához hasonlóan a sejt teljes membránján átfolyó áramokat tudjuk mérni, úgy hogy közben a sejt membránpotenciálját megadott protokoll szerint változtatjuk. A teljes-sejt patch clamp mérések során használt feszültségprotokollt az 5. ábra tartalmazza. A teljes-sejt felállítás kialakításához szükség van arra, hogy a pipettahegy és a sejtmembrán között nagy ellenállású összetapadás, "gigaseal" jöjjön létre. Ezt követően negatív nyomás, illetve elektromos impulzus segítségével a pipetta által közrefogott membráncsík kilyukasztható, így az egész membránfelületről elvezethetővé válik az áram.

A teljes-sejt patch clamp mérésekhez vastag falú boroszilikát üvegből (Standard Glass Capillaries, 4 inch, 1.2 / 0.68 OD/ID, Filament/Fire Polished (Item number: 1B120F-4), World Precision Instruments, Sarasota, Florida) pipettákat húztunk, majd tovább hőkezeléssel (polírozással) még simábbá tettük a hegyüket. A patch pipetta egy Axopatch-1D patch clamp erősítő (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) bemenetéhez csatlakozott. A patch pipettákat a teljes-sejt mérésekhez úgy húztuk, hogy pipettaoldattal megtöltve 3-5 M Ω ellenállásuk legyen. A teljes-sejt mérésekhez használt pipettaoldat összetétele (mM-ban) a következő volt: 140 KCl, 3 MgCl₂, 0.05 EGTA, 1 Na₂-ATP, 0.1 Na₂-GTP és 10 HEPES. Az adatokat 200 Hz-en szűrtük, majd 2 kHz-en digitalizáltuk Digidata 1200 (Axon Instruments, Inc.) vagy Digidata 1550 analóg-digitális jelátalakító segítségével és számítógépen rögzítettük. Az eredményeket pCLAMP10 szoftverrel értékeltük. Az oldatokat hidrosztatikai nyomáskülönbségen alapuló perfúziós rendszerrel jutattuk a sejtekre. A méréseket szobahőmérsékleten (21°C) végeztük. A háttér káliumáramot a két-elektrodos voltage clamp mérésekhez hasonló módon mértük, az ehhez használt oldatok összetétele a következő (mM-ban): 140 NaCl, 3.6 KCl, 0.5 MgCl₂, 2 CaCl₂, 11 glucose és 10 HEPES. A magas [K⁺] oldat 30 mM KCl-ot tartalmazott (26,4 mM NaCl-ot lecseréltünk KCl-ra). Az oldatokat pH 7,4-re vagy pH 6,4-re állítottuk be NaOH segítségével. Használat előtt az oldatokat 0,22 μ m-es szűrővel szűrtük. A kísérletek során használt anyagokat a mérés napján oldottuk fel a mérőoldatokban.



5. ábra Az elektrofiziológiai kísérletek során használt feszültségprotokollok

A, A két elektródos voltage clamp mérések során használt feszültségprotokoll. Az ábrán látható feszültséglépések 4 másodpercenként ismétlődtek. A tartófeszültséget kísérleti felállástól függően 0 vagy -80 mV-ra állítottuk.

B, A teljes sejt patch clamp kísérleteknél használt feszültségprotokoll az állandó feszültséglépések mellett egy egyenletes feszültségváltozást (rámpt) is tartalmazott. A protokollt 2 másodpercenként ismételtük, a tartófeszültséget -80 mV-ra állítottuk.

4.8. Kitépelt foltos (excised patch) patch clamp mérések

A kitépelt foltos (excised patch) patch clamp technika során a szoros kitapadás (gigaseal) kialakulása után kiszakítjuk a membránfoltot a sejtől, így a mérés nem az egész sejten történik, hanem egy izolált membrándarabon. Ennek a technikának előnye az, hogy a membránfoltban kevesebb csatorna található, így akár egyedi csatornák árama is vizsgálhatóvá válik. További előnye a módszernek, hogy mivel a foltot kitéptük a sejtől, a csatornák működése a sejten belüli tényezők zavaró hatása nélkül vizsgálható.

Két mérési felállást különböztetünk meg. Ha a gigaseal kialakulása után tépjük ki a membrándarabot, a membrán EC felülete érintkezik a pipettaoldatunkkal, a fürdőoldattal pedig az IC membránfelület kerül kapcsolatba. Ezt a felállást “inside-out” konfigurációnak nevezzük, ekkor a IC felület érintkezik a fürdőoldattal, ez az oldat gyorsan cserélhető. Ebben az esetben sejtmentes környezetben vizsgálhatjuk a különböző szabályozó tényezők hatását abban az esetben, ha azok a csatornák IC oldalával érintkeznek. A másik mérési felállítás, az “outside-out” konfiguráció esetén a membrán IC felülete érintkezik a pipettaoldattal, az EC oldal pedig a fürdő oldattal érintkezik. Ezt úgy hozhatjuk létre, hogy a membránfoltot a sejtből a teljes-sejt felállás létrejötte után tépjük ki. Ezzel lehetővé válik a csatornát EC oldalról befolyásoló tényezők vizsgálata sejtmentes környezetben.

A kitépelt foltos mérésekhez ugyanazt a patch clamp rendszert használtuk, mint a teljes-sejt mérésekhez. Az egyedi csatornás mérések esetén azonban az adatokat 2 kHz-en szűrtük, a mintavételezés pedig 20 kHz-en történt. Kiértékelés előtt az adatokat 200 Hz-en szűrtük, majd a pCLAMP10 programmal értékeltük azokat.

A *Xenopus laevis* petesejt expressziós rendszer jól használható kitépelt foltos mérésekhez is. Nagy előnye a petesejteknek, hogy az injektált RNS mennyiségének változtatásával a felületi csatornasűrűség befolyásolható, így a kitépelt membránfoltban található csatornák száma is. Konstrukciónként így meg lehetett találni azt az RNS mennyiséget, ami ideálisnak bizonyult az egyedi csatornás mérésekhez. A petesejteken két nappal az injektálás után végeztük az egyedi csatornás méréseket. Mérés előtt a petesejtek vitellin membránját el kell távolítani a sejtekről. Hiperozmotikus körülmények között a vitellin hártya elválik a sejttől, ekkor finom végű csipeszekkel el lehet azt távolítani a sejt megsértése nélkül. Ezt követően a petesejtet behelyeztük a mérőkamrába, egy speciális petesejttartó kádba.

Az inside-out felállásban történő méréseket +60 mV-os membránpotenciál mellett végeztük. A pipettaoldat tartalma (mM-ban): 136 NaCl, 4 KCl, 5 EGTA, 1 MgCl₂ és 10 HEPES (pH 7,4 NaOH-al). Ezzel az oldattal megtöltve a pipetták ellenállása 3-7 MΩ volt. A K⁺-mentes fürdőoldat tartalma a következő volt (mM-ban): 140 NaCl, 5 EGTA, 1 MgCl₂ és 10 HEPES (pH 7,1 NaOH-al). A magas [K⁺] fürdőoldat az alábbiakat tartalmazta (mM-ban): 140 KCl, 5 EGTA, 1 MgCl₂ és 10 HEPES (pH 7,1 KOH-al).

Outside-out felállásban is végeztünk méréseket *Xenopus* petesejtekből és DRG neuronokból származó membránfoltokon. A pipettaoldat összetétele a következő volt (mM-ban): 140 KCl, 5 EGTA, 1 MgCl₂ és 10 HEPES (pH 7,1 KOH-al). A fürdőoldat összetétele megegyezett a pipettaoldatével, az oldat pH értékét viszont 7,4-re vagy 6,4-re állítottuk be. A mérések során használt gátlószereket a mérés napján oldottuk fel a mérőoldatban. A mérés megkezdése előtt meghatároztuk a foltban található csatorna (csatornák) megfordulási potenciálját. A TREK csatornák elsősorban K⁺-ra permeábilisak, ezért szimmetrikus [K⁺] oldatokban a megfordulási potenciál értéke 0 mV köré várható. Azokat a foltokat, ahol más megfordulási potenciált tapasztaltunk, nem használtuk fel a kiértékeléshez.

A kitépelt foltos mérések során kapott regisztrátumokból áramamplitúdó hisztogramokat készítettünk. Ehhez az adott regisztrátumon előforduló áramerősség tartományt kis szakaszokra osztottuk, majd meghatároztuk, hogy az adott tartományba hány pont tartozik. A hisztogramra Gauss-görbét illesztettünk, a görbék csúcsainak távolsága adja meg a csatorna egységáramát (az adott feszültségen). Az egységáram és a feszültség ismeretében meg tudtuk határozni a csatorna vezetőképességét is. Ezenkívül meg tudtuk határozni a csatornák nyitvatartási valószínűségét (P_o) is. A csatornaszám (N) és a P_o ismeretében ki tudtuk számolni a csatornaaktivitást is (NP_o).

2. Táblázat: Az elektrofiziológiai mérések során használt oldatok

Oldat neve	Összetétele (mM-ban)
Fürdő oldatok	
Oocita két elektródos voltage clamp, alacsony [K ⁺]	NaCl 95,4, KCl 2, CaCl ₂ 1,8, HEPES 5
Oocita két elektródos voltage clamp, magas [K ⁺]	NaCl 17,4, KCl 80, CaCl ₂ 1,8, HEPES 5
Teljes sejt patch clamp, alacsony [K ⁺]	140 NaCl, 3.6 KCl, 0,5 MgCl ₂ , 2 CaCl ₂ , 11 glükóz, 10 HEPES
Teljes sejt patch clamp, magas [K ⁺]	113,6 NaCl, 30 KCl, 0,5 MgCl ₂ , 2 CaCl ₂ , 11 glükóz, 10 HEPES
Kitépett foltos patch clamp, K ⁺ -mentes	140 NaCl, 5 EGTA, 1 MgCl ₂ , 10 HEPES
Kitépett foltos patch clamp, magas [K ⁺]	140 NaCl, 5 EGTA, 1 MgCl ₂ , 10 HEPES
Pipetta oldatok	
Teljes sejt patch clamp	140 KCl, 3 MgCl ₂ , 0,05 EGTA, 1 Na ₂ -ATP, 0,1 Na ₂ -GTP, 10 HEPES
Kitépett foltos patch clamp, alacsony [K ⁺]	136 NaCl, 4 KCl, 5 EGTA, 1 MgCl ₂ , 10 HEPES
Kitépett foltos patch clamp, szimmetrikus [K ⁺]	140 KCl, 5 EGTA, 1 MgCl ₂ , 10 HEPES

4.9. Membránfrakció preparálás *Xenopus* petesejtekből, Western blot kísérletek

Munkám során biokémiai módszerekkel is igazoltunk fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Ehhez a fehérjéket epitóppal jelöltük meg és ezeket *Xenopus* petesejtekben fejeztük ki. A fehérjéket kifejező petesejtekből az injektálás után két nappal membránfrakciót preparáltunk, a munka minden fázisát 4 °C-on hajtottuk végre. A petesejteket homogenizáltuk Potter homogenizáló segítségével az alábbi oldatban (a koncentrációk mM-ban megadva): 90 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7,9 NaOH-al). A homogenizátumot 1.000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót megtartottuk és megismételtük a centrifugálást. A felülúszót ezt követően 16.000 g-n 20 percig centrifugáltuk.

A centrifugálás után a felülúszót kidobtuk és a membránfrakciót tartalmazó pelletet reszuszpendáltuk a homogenizáló oldatban és újra centrifugáltuk 16.000 g-n 20 percig. Ezt követően a pelletet felvettük a szolubilizáló oldatban, aminek összetétele a következő volt (mM-ban): NaCl 250, EDTA 2, HEPES 50 (pH 7.4) valamint glicerin (10%) és Triton-X 100 (1%). A mintákat három óráig forgattuk 4 °C-on. Mind a homogenizáló oldat, mind a szolubilizáló oldat tartalmazott proteázgátlókat. A szolubilizálási lépést követően a mintákat ismét 16.000 g-n, 20 percig centrifugáltuk. A szolubilizált membránfrakciót tartalmazó felülúszót hozzáadtuk 30 µl, előzetesen ekvilibráltatott agaróz gyantához. Az agaróz gyantához kecske poliklonális anti-V5 antitest volt hozzákötve (1229, Abcam, Cambridge, UK). A mintákat egy éjszákán át forgatással kevertük össze a gyantával. Másnap a gyantát 5.000g-n 1 percig centrifugáltuk, majd háromszor mostuk a szolubilizáló oldattal. A gyantához hozzákötődött fehérjéket SDS tartalmú mintapufferbe eluáltuk. A mintákat 90 °C-on 15 percig főztük, majd SDS-PAGE technikával szétválasztottuk őket. Az SDS gélekről a fehérjéket PVDF membránokra vittük át, majd a fehérjéket Western blot technikával láthatóvá tettük. Ehhez egér monoklonális anti-FLAG M2 antitestet (F3165, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), valamint tormaperoxidáz enzimmel konjugált, kecske eredetű anti-egér IgG antitesteket használtunk (R05071, Advansta, Menlo Park, CA). Az antitesteket 10.000-szeres hígításban használtuk.

4.10. Statisztikai elemzés

A kísérleti adatok összehasonlítását az adott kísérleti típusnak megfelelő statisztikai próbával végeztem, az Origin8 program (OriginLab Corporation, Northampton, MA) felhasználásával. Az adatok többségét Student-féle t-próbával hasonlítottam össze, valamint használtam egyutas variancaanalízist (Analysis of variance, ANOVA) Tukey-féle post hoc teszttel. Ahol az adatokat nem lehetett parametrikus statisztikai próbával összehasonlítani, a megfelelő nem-parametrikus statisztikai próbát végeztem el a Statistica programcsomag felhasználásával (13.2 verzió, Dell Inc., Tulsa, OK). A kísérletekhez tartozó elemszámot megadtam a szövegben, valamint az ábraalírásokban is. Statisztikai elemzésünk során a 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük statisztikailag jelentősnek.

5. Eredmények

5.1. TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimerizációjának vizsgálata

5.1.1. A TREK-1/TREK-2 heterodimer tandem konstrukcióval modellezhető

A TREK-1 és TREK-2 alegységek heteromerizációjának vizsgálatához először egy olyan konstrukciót hoztunk létre, amivel modellezhető a feltételezett heterodimer csatorna. Az irodalomban számos példa ismert arra, hogy molekuláris biológiai módszerekkel olyan plazmidot szerkesztenek, mely több csatorna alegységet kódol egyetlen fehérjeláncként (176). Ezt a megközelítést korábban munkacsoportunk is használta a TASK-1 és TASK-3 alegységek heteromerizációjának, valamint a TREK-2 ruténiumvörös érzékenységeinek vizsgálatokor (85, 156)

Létrehoztunk egy olyan konstrukciót, melyben a TREK-2 és TREK-1 alegységeket egy aminosav lánc kódolja (TREK-2/TREK-1, „Tandem” csatorna). *Xenopus laevis* petesejtekben kifejeztük ezt a mesterségesen összekapcsolt csatornát, majd a petesejt membránján átfolyó áramot két elektródos voltage clamp technikával mértük -100 mV-on. Ha a külső K^+ koncentrációt 2 mM-ról 40 mM-ra emeltük, a befelé irányuló áram megnőtt ($2,6 \pm 0,35$ nA-el, $n=5$ pete). Ezt az áram növekedést egy befelé irányuló K^+ -áram okozza, ami arra utal, hogy a tandem konstrukció működő K^+ -csatornát hoz létre.

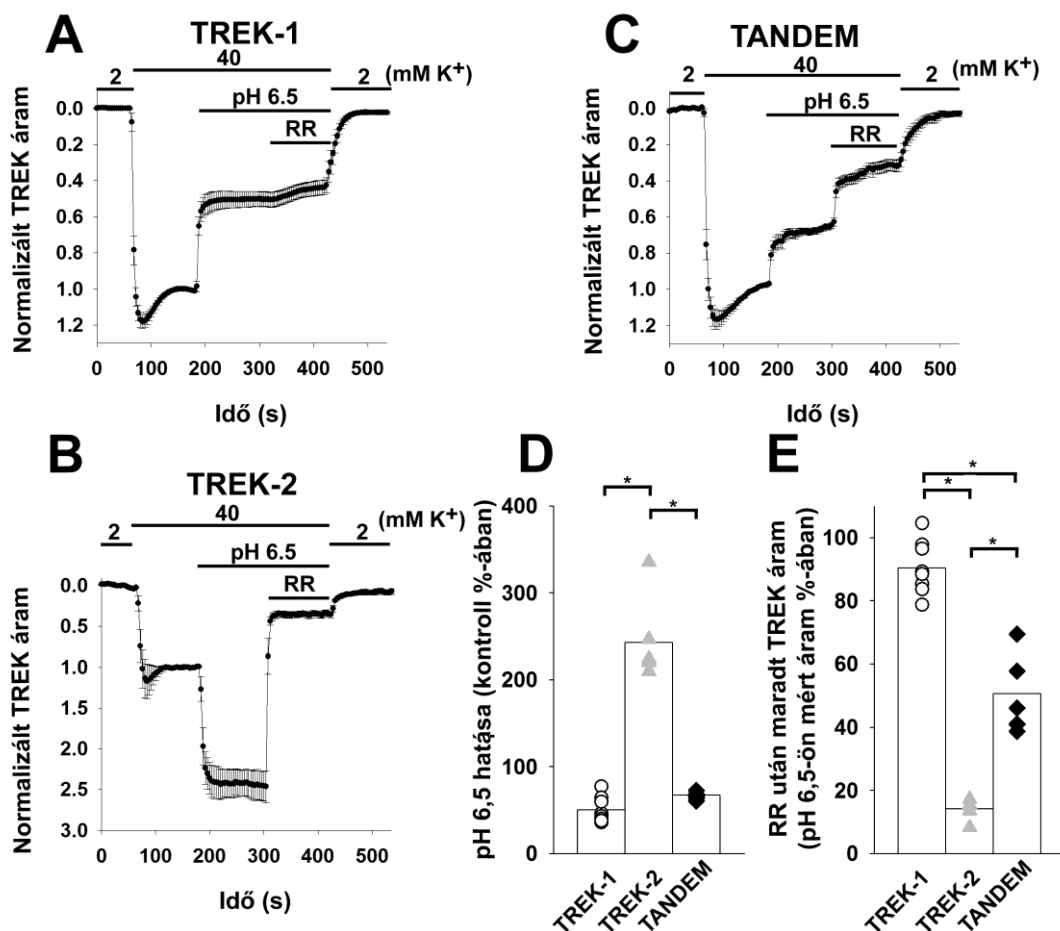
Elvileg fennállhat a lehetősége annak, hogy egy tandem fehérjemolekula egyes részei (a TREK-1 és TREK-2 alegység) nem az adott molekulán belül kapcsolódnak egymáshoz, hanem egy másik tandem megfelelő alegységével alkotnak homodimert (intermolekuláris kölcsönhatás révén). Ilymódon a tandem konstrukció is eredményezhetne működőképes homodimereket, tehát nem lenne alkalmas a heterodimer modellezésére. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára/kizárására a tandem csatorna TREK-1 alegységének első pórusdoménjébe PCR alapú mutagenézissel bevittünk egy ismertén domináns negatív hatású glicin-glutamát mutációt. E mutáns csatornák esetében a petesejt K^+ -árama 5%-a volt a vad típusú alegységekből álló csatornákénak (a magas K^+ -koncentrációjú oldatban $0,16 \pm 0,02$ nA-el nőtt meg a befelé irányuló áram, $n=5$ pete), amely áram nagysága összevethető a nem injektált petesejtek endogén áramaival (az eredményt nem mutatom). Ez tehát arra utal, hogy a tandem konstrukció esetén az egymáshoz kapcsolt alegységek egymással alkotnak dimert.

Így tehát a TREK-2/TREK-1 tandem alkalmas a TREK-1/TREK-2 heterodimer modellezésére, a későbbiekben fel is használtuk a heterodimer csatorna tulajdonságainak vizsgálatára.

5.1.2. A TREK-2/TREK-1 tandem farmakológiai tulajdonságai alapján elkülöníthető a homodimerektől

A homodimer TREK-1 és TREK-2, valamint a TREK-2/TREK-1 tandem csatorna érzékenységét az EC pH változására, valamint a ruténiumvörösre szintén *Xenopus* petesejtekben, két elektródos voltage clamp módszerrel vizsgáltuk az előző alfejezetben leírt módon. Az irodalmi adatoknak megfelelően (62, 64), az EC oldat savanyítása (pH 8,5-ről pH 6,5-re) a TREK-1 csatornát gátolta (49,7±4,3% gátlás a pH 8,5-ben mért értékhez képest, n=10 pete, 6. ábra A és D panel). A pH csökkentése a TREK-2 áramot jelentősen növelte (az áram a pH 8,5-ben mért érték 243,3±17,5%-a volt, n=6 pete, 6. ábra B és D panel). A tandem csatorna áramát a pH csökkenése a TREK-1 homodimerhez hasonlóan gátolta (32,7±1,4% gátlás, n=8 pete, 6. ábra C és D panel).

A ruténiumvörösről (ruthenium red, RR) munkacsoportunk közölte elsőként, hogy alkalmas a TREK-1 és TREK-2 elkülönítésére. A TREK-2 áramnak hatékony gátlószere a polikationos festék, viszont a szer egyáltalán nem hat a TREK-1 csatornára (85). A ruténiumvörös TREK-2-t gátló hatása nem pH-függő, ugyanis 3 µM RR gátló hatása TREK-2 csatornát kifejező petesejtek háttér K⁺-áramára hasonló volt ha a mérőoldat pH-ját 8,5-re, illetve 6,5-re állítottuk a mérés előtt (az eredményt nem mutatom). Így a TREK-1, TREK-2 és a tandem csatorna jellemzésénél a RR hatását (30 µM) a pH 6,5 hatásának meghatározása után, 6,5-ös pH-n végeztük. Korábbi eredményeinknek megfelelően a TREK-2 áramot a RR nagymértékben gátolta (85,9±2,3% gátlás, n=6 pete, 6. ábra B és E panel), a TREK-1 csatorna pedig érzéketlen volt a ruténiumvörösre (9,6±2,3% gátlás, n=10 pete, 6. ábra A és E panel). A tandem csatorna közepesen érzékeny volt ruténiumvörösre (49,4±4,3% gátlás, n=8 pete, 6. ábra C és E panel). A tandem csatorna és a homodimerek RR érzékenysége közötti különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($p < 10^{-6}$, egyutas ANOVA).



6. ábra A TREK-1, TREK-2 és a TREK-2/TREK-1 tandem csatorna gátlószeres érzékenysége eltérő

Xenopus petesejtetrek TREK-1, TREK-2 vagy TREK-2/TREK-1 tandem csatornát kódoló cRNS-el injektáltunk. A membránon átfolyó áramot az injektálás után 2-3 nappal két elektródos voltage clamp módszerrel mértük -100 mV-on. Az EC [K⁺] értékét 2 és 40 mM között változtattuk a görbék felett jelzett módon. Az EC pH változtatását, illetve a RR (30 μM) hozzáadását szintén a görbék felett jelezzük. A káliumáramot úgy határoztuk meg, hogy a kapott értékekből levontuk az alacsony [K⁺] oldatban mért áram értékét. A káliumáramot normalizáltuk a magas [K⁺] oldatban pH 8,5-ön mért értékre.

A, A TREK-1 csatornát gátolja az EC pH-csökkenés, viszont érzéketlen RR-re (n=10 pete).

B, A TREK-2 csatornát aktiválja az EC pH-csökkenés, a RR pedig hatékony gátlószere (n=6 pete).

C, A TREK-2/TREK-1 csatornát gátolja az EC pH-csökkenés, RR-re pedig közepesen érzékeny (n=8 pete).

D, A TREK-1 (fehér körök) és a tandem (fekete élükre állított négyzetek) csatornákat gátolja az EC pH csökkenése (a gátlás mértéke hasonló volt). A TREK-2 csatornát (szürke háromszögek) viszont aktiválja az EC pH csökkenése. A szimbólumok egy-egy petesejt eredményeit, az oszlopok pedig a csoport átlagát mutatják.

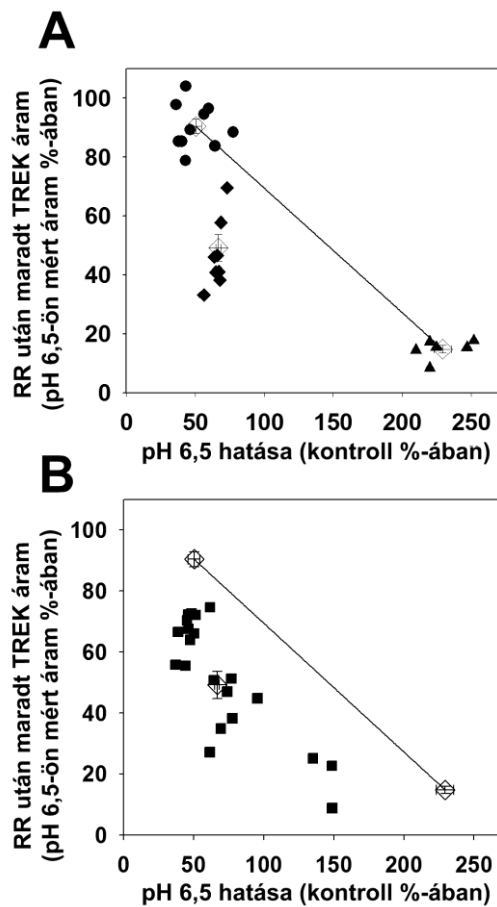
E, A TREK-1 (fehér körök) érzéketlen RR-re, míg a TREK-2 csatornát (szürke háromszögek) a RR jelentősen gátolja. A tandem csatorna (fekete élükre állított négyzetek) RR érzékenysége közepes. A három csoport RR-érzékenysége jelentősen különbözik egymástól ($p < 10^{-6}$). A szimbólumok egy-egy petesejt eredményeit, az oszlopok pedig a csoport átlagát mutatják.

5.1.3. A TREK-1 és TREK-2 heterodimert képeznek heterológ rendszerekben

Az előző kísérletsorozatban azonosítottuk a TREK csatornák két olyan tulajdonságát (EC pH- és RR-érzékenység), amit a tandem konstrukció aszimmetrikus módon „örökölt” a TREK-1 és TREK-2 alegységektől. A tandem csatorna EC savanyodás általi gátlása ugyanis a TREK-1 homodimeréhez hasonlít, míg a csatorna közepes RR-érzékenysége mindkét homodimer RR-érzékenységétől eltér. Ahhoz, hogy a különböző TREK csatornák közötti különbségeket jobban szemléltessük, az előző kísérlet eredményeit úgy ábrázoltuk, hogy a RR hozzáadása után mért áramot a pH csökkentés hatásának a függvényében ábrázoltuk (7. ábra A panel). Az ábra két sarkában láthatóak a TREK-1 (körök) vagy TREK-2 (háromszögek) homodimereket kifejező petesejtekhez tartozó pontok (a csoportok átlagát az üres élére állított négyzetek jelölik). A két homodimer csoport átlagait összekötő egyenes vonalat is feltüntettem az ábrán. Ha a TREK-2/TREK-1 tandem kifejezése során nem keletkeznének heterodimer csatornák, hanem TREK-1 és TREK-2 homodimer csatornák keletkeznének, a tandem csatorna adatpontjai a két homodimer populációt összekötő egyenesre esnének (a két különböző homodimer arányának megfelelően). A tandem csatorna adatpontjai (élére állított négyzetek) viszont jól elkülönülnek mind a homodimerektől, mind a homodimereket összekötő egyenes vonaltól. Tehát a TREK-1 és TREK-2 alegységek kovalens összekapcsolása esetén egy olyan mesterséges TREK-1/TREK-2 heterodimer csatornát kapunk, ami elkülöníthető a homodimerektől az EC savanyodásra és RR adott válasza alapján.

Annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy a TREK-1/TREK-2 heterodimer kialakul-e az alegységek kovalens összekapcsolása nélkül, különböző arányban fejztünk ki TREK-1 és TREK-2 alegységeket *Xenopus* petesejtekben (eltérő arányú TREK-1 és TREK-2 cRNS injektálásával). Az ekkor mérhető TREK áramot vegyesen alkotják TREK-1 és TREK-2 homodimerek, illetve a feltételezett TREK-1/TREK-2 heterodimer (egymáshoz viszonyított arányuk az injektált TREK-1 és TREK-2 cRNS arányától függ). A korábbiakban használt módon meghatároztuk az áram pH- és ruténiumvörös-érzékenységét és a kapott eredményeket az 7. ábra A paneljéhez hasonlóan ábrázoltuk (7. ábra B panel).

Ha a TREK-1 és TREK-2 együttes kifejeződése esetén nem keletkezne heterodimer csatorna, hanem csupán TREK-1 és TREK-2 homodimerek különböző arányban, a kapott adatpontok a TREK-1 és TREK-2 homodimerek átlagát összekötő egyenesre esnének. Jól látható, hogy a TREK-1 és TREK-2 alegységek együttes kifejeződése esetén az adatpontok nem erre az egyenesre esnek. A kapott TREK áram farmakológiai tulajdonságai tehát arra utalnak, hogy a TREK-1 és TREK-2 együttes kifejeződés során nem csak homodimerek keletkeznek, hanem a két alegység spontán is összeáll TREK-1/TREK-2 heterodimerré.



7. ábra A TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimert képeznek *Xenopus* petesejtekben

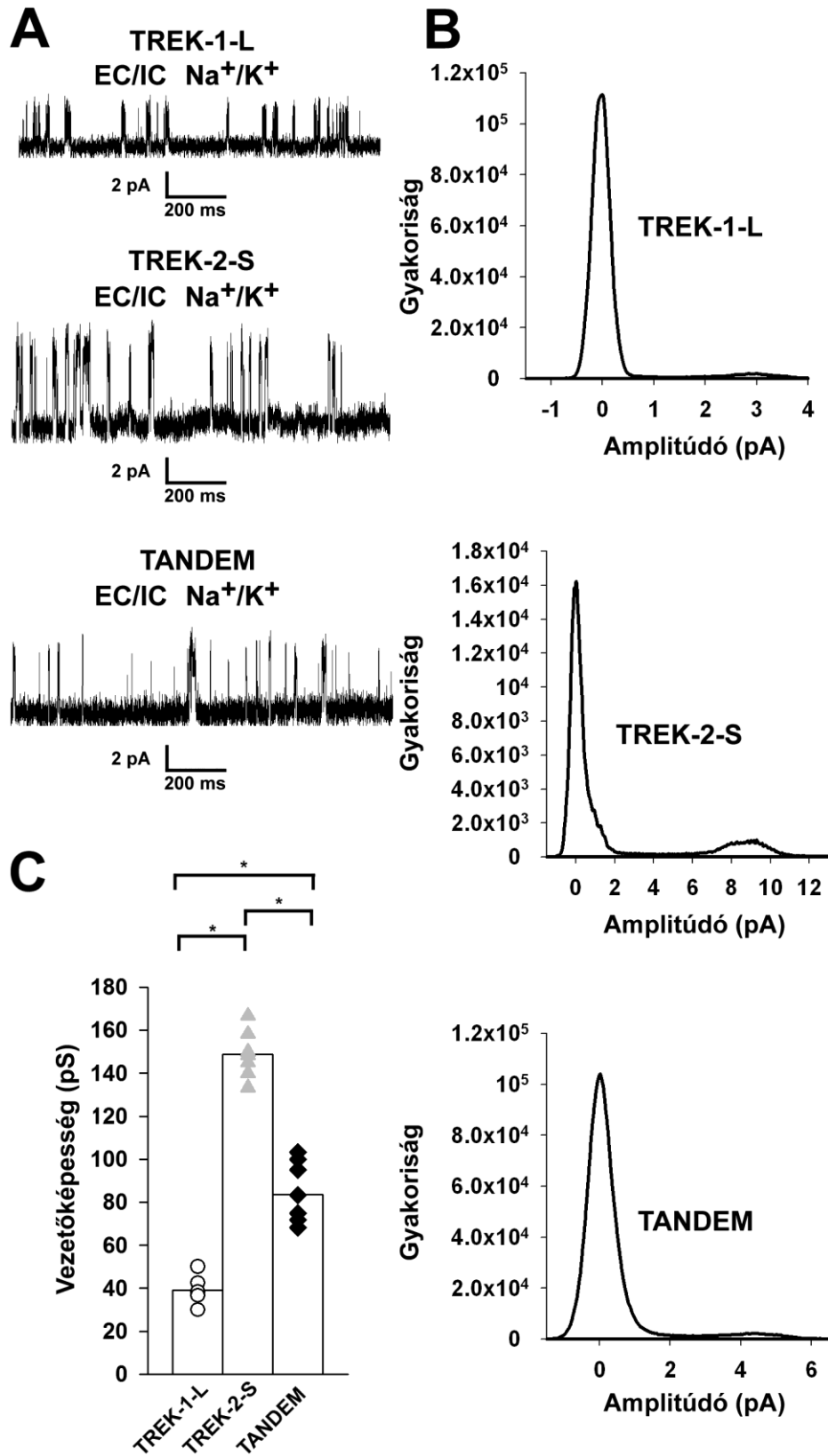
A, *Xenopus* petesejteket TREK-1 (körök), TREK-2 (háromszögek) vagy TREK-2/TREK-1 tandem csatornát (élükre állított négyzetek) kódoló cRNS-el injektáltunk. A két elektródos voltage clamp méréseket az előző (6.) ábrán leírt módon végeztük. A csatornák EC pH- és RR-érzékenységét pontdiagrammként ábráztuk. A három különböző csatorna átlagát (standard hibájukkal együtt) fehér élükre állított négyzetekkel jelöltük. Az egyenes vonal a TREK-1 és TREK-2 homodimereket kifejező csoportok átlagait köti össze.

B, *Xenopus* petesejteket különböző arányú TREK-1 és TREK-2 cRNS-el injektáltunk. A TREK áram pH- és RR-érzékenységét az előző ábrán leírt módon határoztuk meg, és az A panelhez hasonló módon ábráztuk. Az A panelen ábrázolt három csoport átlagát, valamint a 2 homodimer populáció átlagát összekötő vonalat szintén feltüntettük az ábrán.

A heterodimer csatorna keletkezését az egyedi csatornák szintjén is vizsgáltuk. A TREK-1 és TREK-2 elkülöníthető egymástól a csatornák vezetőképessége alapján, az elkülönítést azonban bonyolítja, hogy mindkét alegységnek több, eltérő vezetőképességű formája ismert. A jelenség hátterében az alternatív translációs iniciáció miatt előforduló izoformák eltérő hosszúságú N-terminálisai állnak (36, 37). Ennek a nehézségnek a kiküszöbölésére olyan mutáns TREK csatornákat hoztunk létre, amelyekben csak egy lehetséges START kodon fordul elő. Irodalmi adatok alapján úgy választottuk ki ezeket az izoformákat, hogy a lehető legnagyobb legyen közöttük a vezetőképességbeli különbség. Így tehát létrehoztuk a TREK-2 N-terminális deléciós mutánsát (TREK-2-short, röviden TREK-2-S), illetve a TREK-1 esetén mutációval megszüntettük az alternatív translációs kezdőpontot (TREK-1 M58I, „TREK-1-long”, röviden TREK-1-L). A TREK-1-L és TREK-2-S csatornákat, illetve a két mutáns csatornából létrehozott TREK-2-S/TREK-1-L tandemet kifejeztük *Xenopus* petesejtekben, majd a vad típusú csatornákhöz hasonló módon meghatároztuk pH- és RR-érzékenységüket. A mutáns csatornák pH-ra és RR-re adott válaszuk a vad típusú csatornákéhoz hasonló volt, koexpressziójuk esetén a kapott áram farmakológiai tulajdonságai heterodimer képződésére utaltak (az eredményeket nem mutatom). A mutáns csatornák tehát alkalmasak a heterodimerizáció vizsgálatára.

A TREK1-L, TREK-2-S és a TREK-2-S/TREK-1-L csatornák vezetőképességét a kitépelt membránfoltos („excised patch”) patch clamp technika inside-out felállításában határoztuk meg. Kísérleti felállításunkban a TREK-1-L csatorna vezetőképessége $39,2 \pm 2,7$ pS ($n=6$ membránfolt), a TREK-2-S csatornái pedig $148,8 \pm 4,2$ pS ($n=7$ membránfolt) volt (reprezentatív egy csatornás felvételek az 8. ábra A paneljén, a felvételekhez tartozó áramamplitúdó hisztogramok a B panelen láthatóak). A tandem csatorna vezetőképessége pedig egy köztes értéknek, $83,5 \pm 5,0$ pS-nek adódott ($n=8$ folt). A homodimer csatornák és a tandem csatorna vezetőképességei jelentősen eltértek egymástól (Eredményeinket az 8. ábra C paneljén összesítettük, $p < 0,01$, egyutas ANOVA), tehát a heterodimer csatorna vezetőképessége alapján elkülöníthető a homodimerektől.

A következő kísérletben *Xenopus* petesejteket TREK-1-L és TREK-2-S cRNS-ek különböző arányú keverékeivel injektáltunk, majd meghatároztuk a kitépelt membránfoltokban található csatornák vezetőképességeit (olyan foltokat használtunk fel, amelyekben 1 vagy 2 csatorna volt található). A kapott vezetőképességeket az injektált cRNS arányok függvényében ábrázoltuk (9. ábra, az ábrán feltüntettük a homodimer csatornák és a tandem csatornához tartozó vezetőképességeket is). Három különböző vezetőképességű csatornát találtunk a foltokban: kis vezetőképességű TREK-1-L homodimereket (körökkel jelölve), nagy vezetőképességű TREK-2-S homodimereket (háromszögek), illetve egy közepes vezetőképességű, TREK-1-L/TREK-2-S heterodimernek megfelelő csatornát (élére állított négyzetek). Jól látható, hogy ha az injektált cRNS mennyisége állandó volt, viszont a TREK-2-S cRNS arányát növeltük, nagyobb arányban keletkezett TREK-2-S homodimer, illetve TREK-1-L/TREK-2-S heterodimer. A TREK-1/TREK-2 heterodimer keletkezését így tehát nemcsak az áram farmakológiai tulajdonságai alapján, hanem az egyedi csatornák szintjén is igazoltuk.



(az ábrához tartozó magyarázat a következő oldalon található)

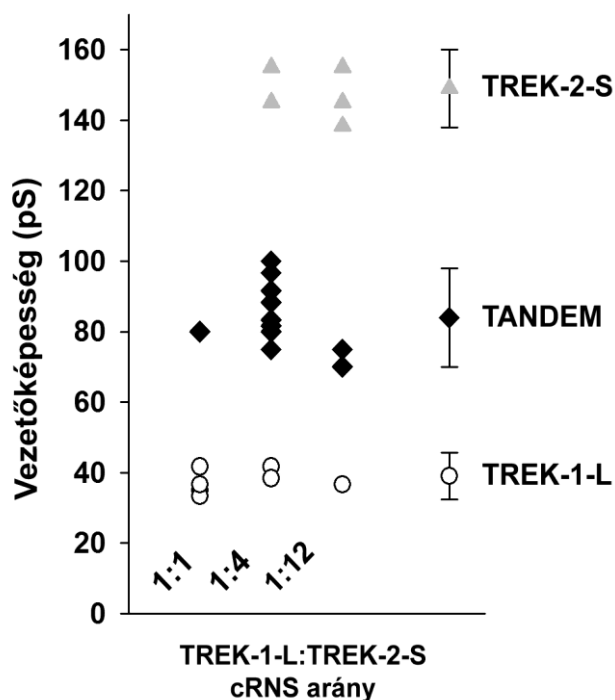
8. ábra Az N-terminális mutáns TREK csatornák vezetőképessége eltérő

Xenopus petesejteket TREK-1-L, TREK-2-S vagy TREK-2-S/TREK-1-L tandem csatornát kódoló cRNS-el injektáltunk. A méréseket kitépett membránfoltokon, inside-out felállásban, +60 mV-on végeztük. A vezetőképesség meghatározásához 30-60 másodpercig mértük az áramot magas $[K^+]$ fürdőben. A mutatott reprezentatív felvételeket 2 kHz-en szűrtük.

A, Reprezentatív felvételek TREK-1-L (felül), TREK-2-S (középen) és TREK-2-S/TREK-1-L tandem csatornákat (alul) kifejező *Xenopus* petesejtekből származó membránfoltokból. Káliummentes fürdőoldatban nem láttunk kifelé irányuló áramot.

B, TREK-1-L (felül), TREK-2-S (középen) és TREK-2-S/TREK-1-L tandem (alul) csatornák felvételeiről áramamplitúdó-hisztogramokat készítettünk. A hisztogramok segítségével meghatároztuk a csatornák egységáramát, illetve vezetőképességét.

C, A TREK-1-L (fehér körök, n=6 folt), TREK-2-S (szürke háromszögek, n=7 folt) és TREK-2-S/TREK-1-L (fekete élére állított négyzetek, n=8 folt) csatornák vezetőképességét pontdiagrammként ábrázoltuk. A csoportok átlagait pedig az oszlopok mutatják. A három csatorna vezetőképessége jelentősen eltért egymástól ($p < 0,01$, egyutas ANOVA).

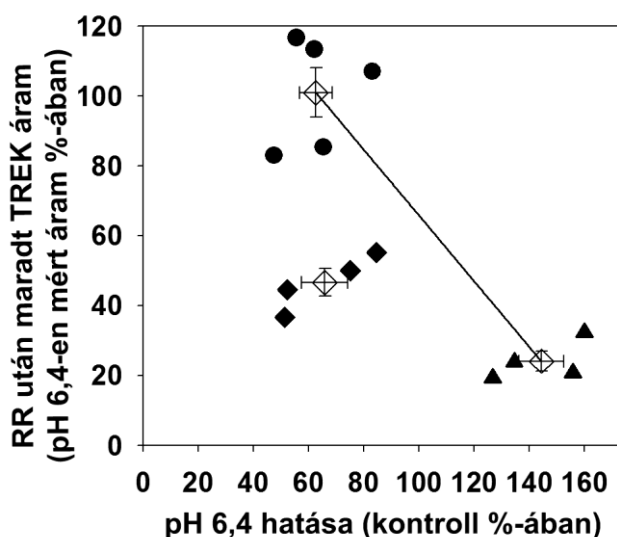


9. ábra A TREK-1-L és TREK-2-S alegységek heterodimert képeznek

Xenopus petesejteket különböző arányú TREK-1-L és TREK-2-S cRNS-el injektáltunk. A petékből membránfoltokat téptünk ki és meghatároztuk a foltban található csatornák vezetőképességét (csak 1 vagy 2 csatornát tartalmazó foltokat használtunk fel a kiértékelésben), majd a vezetőképességeket az injektált cRNS arány függvényében ábrázoltuk. Összehasonlításképpen feltüntettük a TREK-1-L, TREK-2-S és TREK-2-S/TREK-1-L csatornák vezetőképességét (szórással együtt).

A TREK-1/TREK-2 heterodimer keletkezését igazoltuk emlős sejtvonalban is. A TREK-1 és TREK-2 alegységek együttes kifejeződését HEK293T sejtekben úgy oldottuk meg, hogy a két alegységet összekapcsoltuk egy virális peptid szekvenciával, a T2A-val. Ez a szekvencia a transzláció során elhasítja önmagát, így biztosítva van a két alegység 1:1 arányú kifejeződése (179). A TREK-1, TREK-2 és TREK-1-T2A-TREK-2 konstrukciókat kifejeztük HEK293T sejtekben, majd teljes-sejt patch clamp technikával megmértük a TREK áram pH- és RR-érzékenységet. A kapott adatokat a 10. ábrán a *Xenopus* petesejt rendszerben kapott eredményekhez hasonló módon ábrázoltuk.

Korábbi eredményeinknek megfelelően a TREK-1 csatornát gátolta az EC pH 7,4-ről 6,4-re csökkentése ($37,4 \pm 5,9\%$ gátlás, $n=5$ sejt), míg a TREK-2 áramot serkentette a pH csökkenése ($44,3 \pm 8,1\%$ aktiváció, $n=4$ sejt). A TREK-1 csatornára $30 \mu\text{M}$ RR HEK sejtben sem hatott (a szer az áramot $1,1 \pm 7,1\%$ -al aktiválta, $n=5$ sejt), míg a TREK-2 áramot a RR hatékonyan gátolta ($75,9 \pm 2,9\%$ gátlás, $n=4$ sejt). A TREK-1-T2A-TREK-2 konstrukció kifejeződése esetén kapott áram pH- és RR-érzékenysége a *Xenopus* rendszerben kapott eredményekhez hasonlóan eltért attól, amit kizárólag homodimerek keletkezése esetén várnánk. Így tehát a TREK-1 és TREK-2 alegységek nemcsak *Xenopus* petesejtben, hanem emlős sejtvonalonban is heterodimert alkotnak.



10. ábra A TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimert képeznek HEK293T sejtekben

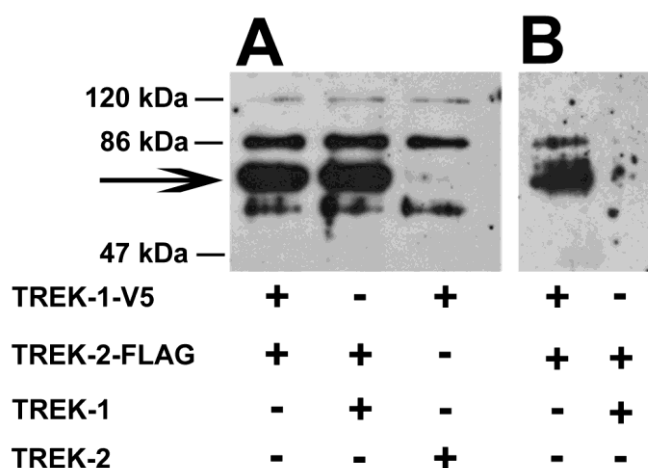
HEK293T sejteket TREK-1 (körök), TREK-2 (háromszögek) vagy TREK-1-T2A-TREK-2 (élére állított négyzetek) konstrukciókat kódoló plazmidokkal transzfektáltunk. A különböző csatornák pH (7,4-ről 6,4-re csökkentettük a fürdőoldat pH-ját) és RR ($30 \mu\text{M}$) érzékenységét pontdiagrammként ábrázoltuk. A három csoport átlagát (standard hibával együtt) fehér élére állított négyzetként ábrázoltuk. A homodimer csatornák átlagait egyenes vonallal kötöttük össze.

A heterodimerizációt nemcsak elektrofiziológiai mérésekkel, hanem biokémiai módszerekkel is alátámasztottuk. Ehhez a csatornák N- vagy C-terminálisát V5, illetve FLAG epitópokkal jelöltük meg (V5-TREK-1 és TREK-2-FLAG). A jelölt csatornák működőképesnek bizonyultak, pH- és RR-érzékenységük a vad típusú csatornáéhoz hasonló volt (az eredményt nem mutatom).

Ezt követően *Xenopus* petesejteket vad típusú és jelölt TREK csatornákat kódoló cRNS-ek különböző kombinációival injektáltunk (ld. 11. ábra A panel). A petesejtekből membránfrakciót preparáltunk, majd a kapott membránfrakciót szolubilizáltuk. A kapott membránfrakciókból 1 petesejtnek megfelelő mennyiségeket futtattunk meg. A TREK-2-FLAG csatornát tartalmazó mintáink hasonló jelet adtak Western bloton az általunk használt FLAG-ellenes ellenanyagra. A TREK-2-FLAG-nek megfelelő 72 kDa-os specifikus jel hiányzott a jelöletlen TREK-2 csatornát tartalmazó mintákból (A panel).

A különböző membránfrakciókhoz ezt követően olyan agaróz gyöngyöket adtunk, amelyeknek a felszínére poliklonális V5-ellenes ellenanyag volt konjugálva. A gyöngyökhöz hozzákötődő fehérjéket háromszori mosás után SDS-t tartalmazó mintapufferbe eluáltuk, majd a mintákat felmelegítettük (90 °C, 15 perc) és 1 petesejtnek megfelelő mennyiségeket futtattunk meg és végeztünk Western blotot az A panelben használt ellenanyaggal (11. ábra B panel).

A vad típusú TREK-1-et és TREK-2-FLAG-et tartalmazó minta esetén nem kaptunk specifikus jelet (11. ábra B panel, 2. sáv). Ezzel szemben a V5-TREK-1 és TREK-2-FLAG csatornákat kifejező petékből származó minta esetén kaptunk TREK-2-FLAG-nek megfelelő jelet (11. ábra B panel, 1. sáv), tehát a két alegység együtt tisztul. Ezek az eredmények a korábbi elektrofiziológiai kísérletekkel együtt a két alegység összeépülésére utalnak.



11. ábra A TREK-1 és TREK-2 alegységek együtt tisztulnak

Xenopus petesejtet vad típusú vagy epitóppal jelölt TREK-1 és TREK-2 alegységeket kódoló konstrukciókkal injektáltunk az ábrán jelölt módon. A mutatott felvételekhez hasonló eredményt kaptunk 3 független kísérlet esetén.

A, A petesejtekből teljes membránfrakciókat preparáltunk, majd szolubilizálás után a fehérjéket SDS-PAGE-el szétválasztottuk. A szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránokra blottoltuk, majd monoklonális FLAG-ellenes elsődleges ellenanyaggal Western blotot végeztünk. A másodlagos ellenanyag egy tormaperoxidázzal jelölt egér IgG ellenes antitest volt. A nyíl a TREK-2-FLAG-nek megfelelő reaktivitást mutatja.

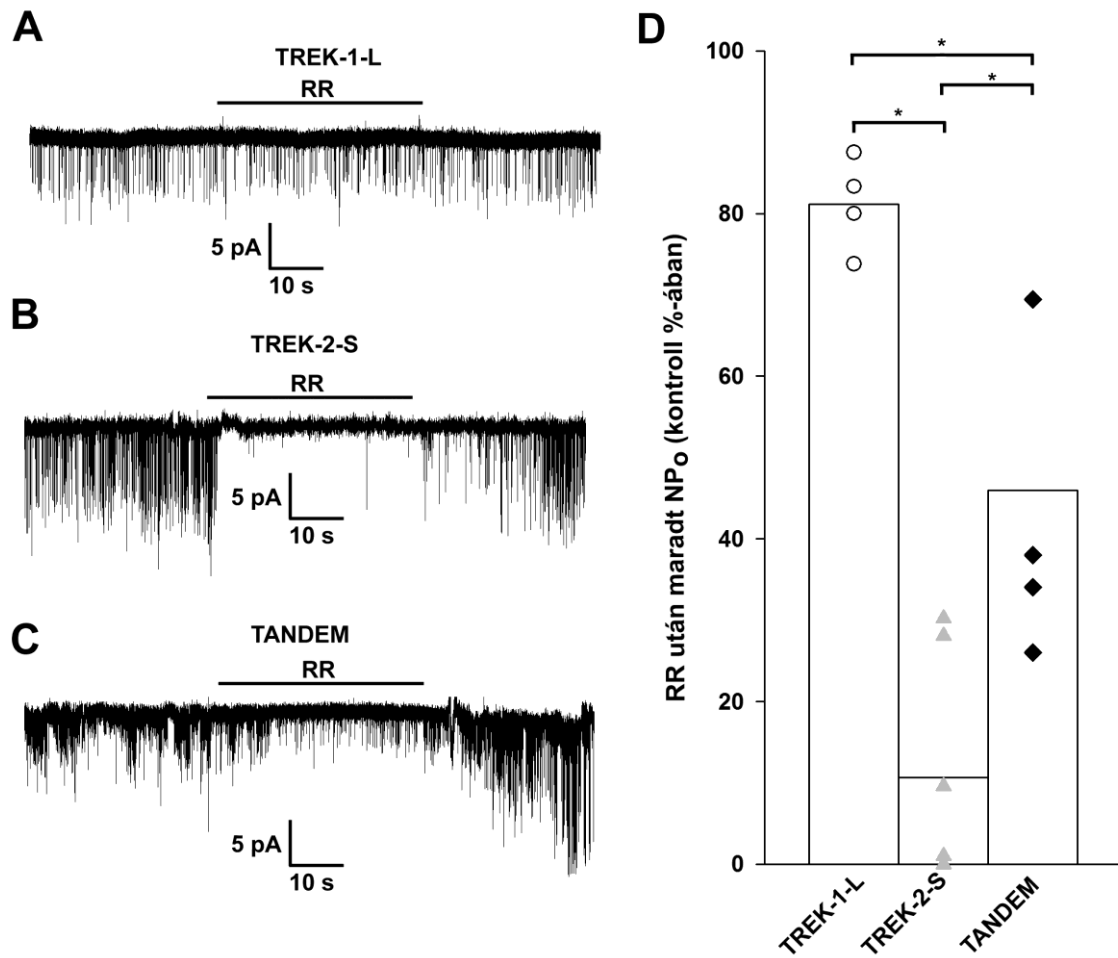
B. A szolubilizált membránfrakciókat poliklonális V5 antitestet kötő gyöngyök felhasználásával tisztítottuk. A gyöngyökről eluált fehérjéket az A panelben leírt módon vizsgáltuk tovább.

5.1.4. A TREK-1/TREK-2 heterodimer farmakológiailag elkülöníthető az egyedi csatornák szintjén a homodimerektől

Az előző kísérletekben igazoltuk, hogy a TREK-1 és TREK-2 alegységek működőképes heterodimereket képeznek heterológ expressziós rendszerekben. Azonban a heterológ expressziós rendszerekben használt megközelítések nem alkalmasak a heterodimer kimutatására primer sejtekben. Az általunk felhasznált farmakológiai eszközök (pH, RR) ugyanis számos egyéb ioncsatorna működését befolyásolják, ezért primer sejtekben végzett *teljes sejt* mérésekben nem használhatóak a heterodimer azonosítására. A két alegység kölcsönhatásának vizsgálata biokémiai módszerekkel natív sejtekben nehezen megoldható megbízható ellenanyagok hiányában. A heterodimer azonosítása natív sejtekben nem megoldható vezetőképesség meghatározása alapján, mint ahogyan a *Xenopus* expressziós rendszerben tettük.

Primer sejtben ugyanis nem tudjuk kiküszöbölni az alternatív transzlációs iniciáció jelenségét, ezért számos különböző konduktanciájú TREK homo- és heterodimer keletkezhet. A heterodimer kimutatására felmerült az a lehetőség, hogy az *egyedi csatornáknak* nem a vezetőképességét, hanem a különböző farmakológiai szerekre adott válaszait vizsgáljuk. Ezzel mind a gátlószerek nem megfelelő szelektivitása, mind a több lehetséges konduktanciaszint problémája kiküszöbölhető. A különböző TREK csatornák farmakológiai tulajdonságainak feltérképezésére a korábbi kísérletekben használt konstrukciókat használtuk (TREK-1-L, TREK-2-S, ill. a belőlük készült tandem). A csatornákat ismét *Xenopus* petesejtekben fejeztük ki, a méréseket viszont outside-out felállásban végeztük.

Először a ruténiumvörös hatását vizsgáltuk. A kitépelt membránfoltokhoz 30 μM RR-t adtunk, majd meghatároztuk a csatorna aktivitását a szer hozzáadása előtt, közben és után. Teljes sejtes eredményeinkhez megfelelően a RR a TREK-1-L csatornát kismértékben gátolta ($19\pm 3\%$, $n=4$ folt), viszont a TREK-2-S csatornát jelentősen gátolta (90 ± 6 , $n=7$ folt, ld. 12. ábra, A és B panel). A tandem csatorna esetén pedig közepes mértékű gátlást figyelhettünk meg ($55\pm 11\%$, $n=4$ folt 12. ábra C panel). A RR hatása mindhárom csatorna esetén reverzibilis volt. A gátlás mértéke jelentősen különbözött a homo- és heterodimerek között ($p<0,025$, egyutas ANOVA), ahogyan az várható volt a teljes sejtes méréseink alapján.



12. ábra Ruténium vörös hatása egyedi TREK csatornákra

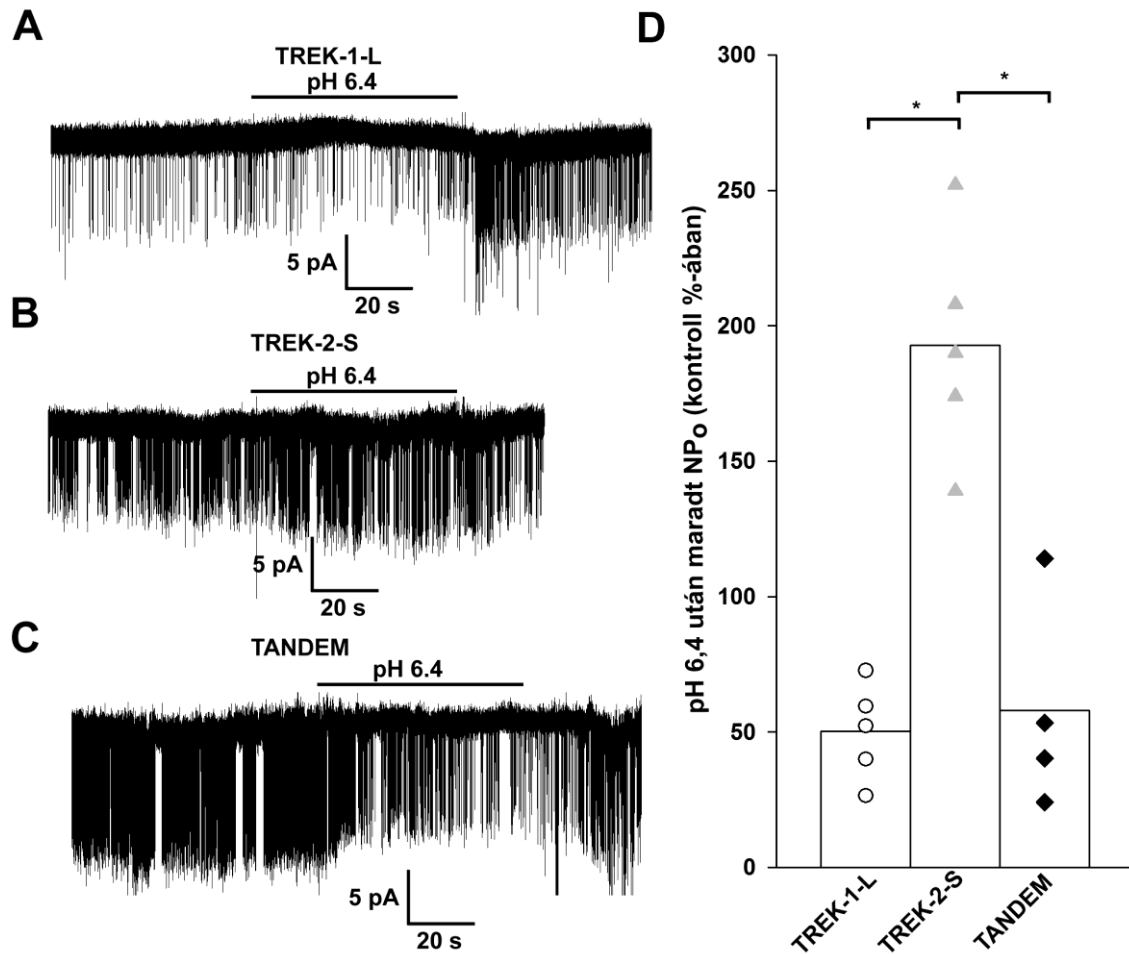
Xenopus petesejteket TREK-1-L, TREK-2-S vagy TREK-2-S/TREK-1-L tandem csatornát kódoló cRNS-el injektáltunk. Az egyedi csatornák áramát outside-out felállásban, szimmetrikus 140 mM $[K^+]$ oldatban és -60 mV-on mértük. A mutatott reprezentatív felvételeket 2 kHz-en szűrtük.

A-C, Reprezentatív felvételek TREK-1-L (A), TREK-2-S (B) és TREK-2-S/TREK-1-L csatornát tartalmazó membránfoltokról. A ruténium vörös (30 μ M) hozzáadását a görbék felett jelezzük. A RR hatása reverzibilis volt. A csatornaaktivitást (NP_o) 30-60 másodperces felvételekből határoztuk meg a RR hozzáadása előtt, közben és után.

D, A RR (30 μ M) a TREK-1-L (fehér körök, n=4 folt), TREK-2-S (szürke háromszögek, n=7 folt) és a TREK-2-S/TREK-1-L (fekete élére állított négyzetek, n=4 folt) csatornák aktivitására kifejtett hatását pontdiagrammként ábrázoltuk. A csoportok átlagát oszlopként mutatjuk. A különböző csatornák RR-érzékenysége jelentősen eltért egymástól ($p < 0,025$).

Ezt követően megvizsgáltuk az EC pH csökkenés hatását. A kitépelt membránfoltokra adott oldat pH értékét 7,4-ről 6,4-re csökkentettük, majd meghatároztuk a csatorna aktivitását a pH csökkentés előtt, közben és után. A TREK-1-L homodimert ($50\pm 8\%$ gátlás, $n=5$ folt) és a TREK-2-S/TREK-1-L tandemet ($42\pm 20\%$ gátlás, $n=4$ folt) hasonló mértékben gátolta a pH csökkenése (reprezentatív felvételek az 13. ábra A és C paneljén). Ezzel szemben a TREK-2-S esetén a pH csökkenése aktiválta a csatornát ($192\pm 19\%$, $n=5$ folt). Így tehát a RR-höz hasonlóan a pH csökkenése esetén is a teljes sejtes mérésekhez hasonló eredményeket kaptunk (eredményeinket az 13. ábra D paneljén foglaltuk össze).

Irodalmi adatok alapján a spadin nevű polipeptid a TREK-1 csatorna szelektív gátlószere, a TREK-2 csatorna működését nem befolyásolja (93). A spadin hatását az egyedi csatornák szintjén, kitépelt membránfoltokban vizsgáltuk, a peptidet $1\ \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmaztuk. A vártnak megfelelően a TREK-1-et hatékonyan gátolta ($60\pm 11,2\%$, $n=4$ membránfolt, 14. ábra A panel), a TREK-2-re viszont nem hatott (spadin jelenlétében a kontroll csatornaaktivitás $101\pm 14,4\%$ volt megfigyelhető, $n=4$ folt, 14. ábra B panel). Érdekes módon a TREK-2-S/TREK-1-L tandem csatornát is gátolta a peptid ($85\pm 12\%$, $n=5$ folt, 14. ábra C panel). A gátlás mértéke a TREK-2-S homodimer és a TREK-2-S/TREK-1-L között jelentősen különbözött, viszont a tandem csatorna és a TREK-1 homodimer között nem volt statisztikailag jelentős a különbség (14. ábra D panel, egyutas ANOVA). Eredményeink alapján tehát a spadin érzékenységhez elegendő, ha a dimer egy TREK-1 alegységet tartalmaz.

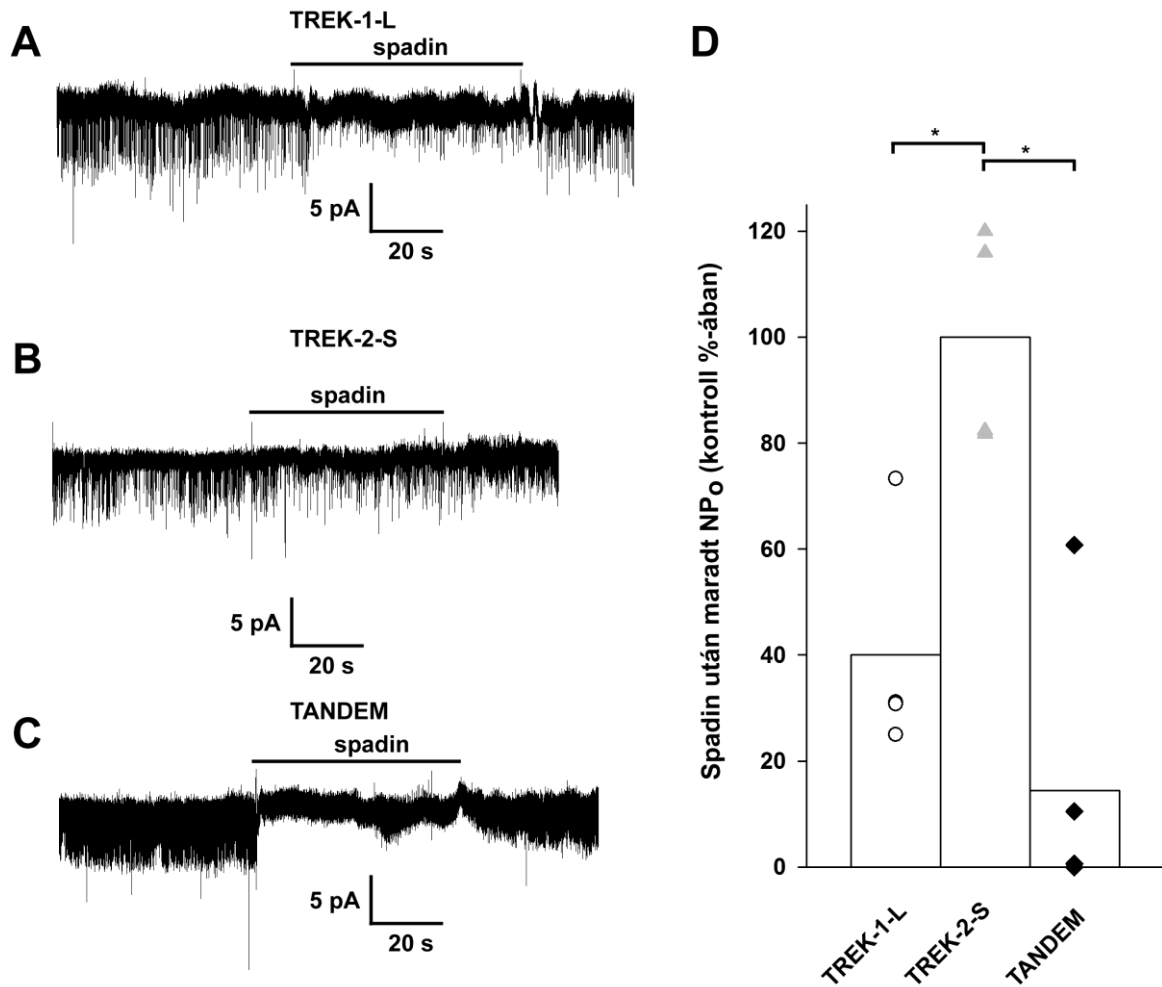


13. ábra Extracelluláris pH-csökkenés hatása egyedi TREK csatornákra

Xenopus petesejteket TREK-1-L, TREK-2-S vagy TREK-2-S/TREK-1-L tandem csatornát kódoló cRNS-el injektáltunk. Az egyedi csatornák áramát outside-out felállásban, szimmetrikus 140 mM $[K^+]$ oldatban és -60 mV-on mértük. A mutatott reprezentatív felvételeket 2 kHz-en szűrtük.

A-C, Reprezentatív felvételek TREK-1-L (A), TREK-2-S (B) és TREK-2-S/TREK-1-L csatornát tartalmazó membránfoltokról. A pH csökkentését (7,4-ről 6,4-re) a görbék felett jelezzük. A pH csökkenés hatása reverzibilis volt. A csatornaaktivitást (NP_o) 30-60 másodperces felvételekből határoztuk meg a pH 6,4-es fürdőoldat hozzáadása előtt, közben és után.

D, A pH csökkenés TREK-1-L (fehér körök, n=5 folt), TREK-2-S (szürke háromszögek, n=5 folt) és a TREK-2-S/TREK-1-L (fekete élére állított négyzetek, n=4 folt) csatornák aktivitására kifejtett hatását pontdiagrammként ábrázoltuk. A csoportok átlagát oszlopként mutatjuk. Az EC pH csökkenés hatására a TREK-2-S csatorna aktivitása jelentősen megnőtt ($p < 0,01$).



14. ábra Spadin hatása egyedi TREK csatornákra

Xenopus petesejteket TREK-1-L, TREK-2-S vagy TREK-2-S/TREK-1-L tandem csatornát kódoló cRNS-el injektáltunk. Az egyedi csatornák áramát outside-out felállásban, szimmetrikus 140 mM $[K^+]$ oldatban és -60 mV-on mértük. A mutatott reprezentatív felvételeket 2 kHz-en szűrtük.

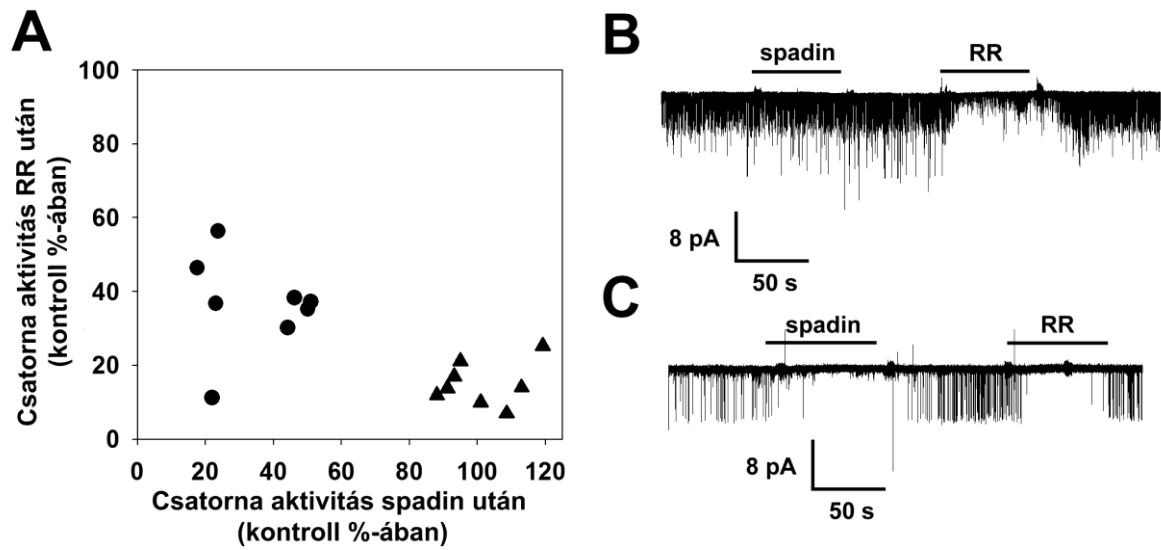
A-C, Reprezentatív felvételek TREK-1-L (A), TREK-2-S (B) és TREK-2-S/TREK-1-L csatornát tartalmazó membránfoltokról. A spadin (1 μ M) hozzáadását a görbék felett jelezzük. A spadin hatása reverzibilis volt. A csatornaaktivitást (NP_o) 30-60 másodperces felvételekből határoztuk meg a spadin hozzáadása előtt, közben és után.

D, A spadin (1 μ M) a TREK-1-L (fehér körök, n=4 folt), TREK-2-S (szürke háromszögek, n=4 folt) és a TREK-2-S/TREK-1-L (fekete élére állított négyzetek, n=5 folt) csatornák aktivitására kifejtett hatását pontdiagrammként ábrázoltuk. A csoportok átlagát oszlopként mutatjuk. A spadin hatására létrejövő csatornaaktivitás változás TREK-1-L és a TREK-2-S/TREK-1-L csatornák esetén jelentősen eltért a TREK-2-S esetén mért változástól ($p < 0,05$).

5.1.5. A TREK-1/TREK-2 heterodimer kimutatható DRG neuronokban

A különböző gátlószerek egyedi csatornákra kifejtett hatásai alapján a TREK-1/TREK-2 heterodimer elkülönítése a homodimerektől a homo- és heterodimerek eltérő spadin- és RR-érzékenysége alapján lehetséges. A TREK-1 homodimer spadin-érzékeny, viszont RR-re rezisztens, míg a TREK-2 homodimerre a spadin nem hat, a RR viszont gátolja. A TREK-1/TREK-2 heterodimert viszont mind a spadin, mind a RR gátolja.

A TREK-1 és TREK-2 együttes kifejeződését DRG idegsejt több kutatócsoport különböző módszerekkel leírta korábban (48, 43, 49), így a két alegység heterodimerizációját megvizsgáltuk felnőtt egerekből izolált DRG idegsejtekben. A méréseket outside-out felállásban, -60 mV-on végeztük, a vizsgált 25 membránfoltból 16-ban találtunk K⁺-csatornát. Csak olyan foltokat vettünk bele az elemzésbe, ahol 1 vagy 2 csatorna volt található, így összesen 21 csatornát azonosítottunk (Gátlószeres érzékenységüket az 15. ábra A paneljén foglaltuk össze). Négy csatorna mind a RR-re, mind a spadinra érzéketlen volt. Nyolc csatornát találtunk, amire a spadin nem hatott, a RR viszont jelentősen gátolta a csatornákat (reprezentatív felvétel az 15. ábra B paneljén látható, a foltban 2 csatorna található). Kilenc csatorna azonban mind spadinna, mind RR-el gátolható volt (reprezentatív felvételért ld. az 15. ábra C paneljét). Ez az érzékenységi profil arra utal, hogy az adott csatorna mind TREK-1, mind TREK-2 alegységet tartalmazott, azaz TREK-1/TREK-2 heterodimer keletkezett. Így tehát igazoltuk, hogy a TREK-1 és TREK-2 heterodimerizációja primer sejtekben is bekövetkezik.



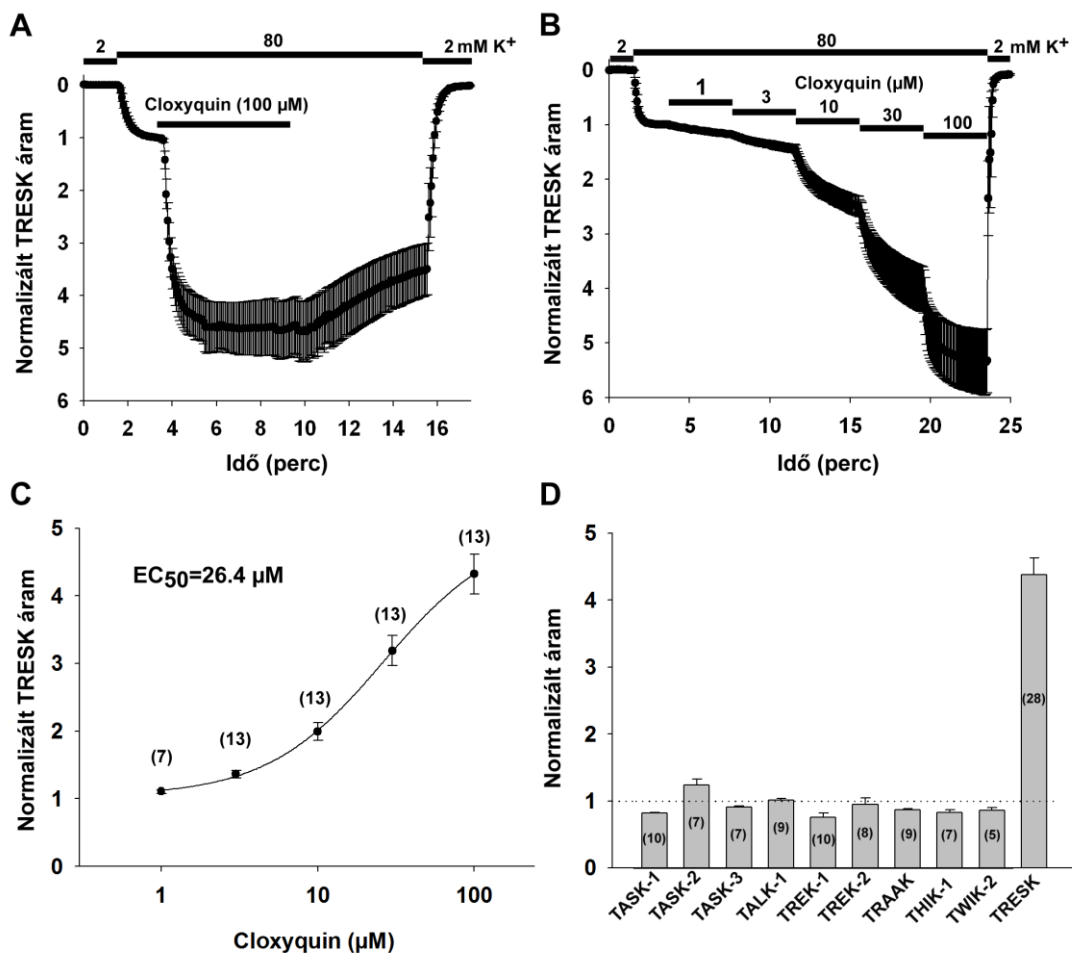
15. ábra A TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimert képeznek hátsó gyöki ganglion idegsejtekben

Hátsó gyöki ganglion idegsejtekből outside-out felállásban membránfoltokat téptünk ki. A csatornák áramát -60 mV-on, szimmetrikus 140 mM $[K^+]$ oldatban mértük. A spadin ($1 \mu\text{M}$) és RR ($30 \mu\text{M}$) hozzáadását a görbék fölött jelezzük. A csatornaaktivitást 30-60 másodperces felvételekből határoztuk meg a spadin, illetve RR hozzáadása előtt, közben és után. A mutatott felvételeket 2 kHz-en szűrtük. A spadinra és RR egyaránt érzéketlen csatornákat nem ábrázoltuk ($n=4$).

5.2. A cloxyquin hatása a TRESK csatornára

5.2.1. A cloxyquin az egér TRESK csatorna szelektív aktivátora

A cloxyquinról munkánk kezdetén ismert volt, hogy a TRESK csatorna aktivátora, viszont a szer szelektivitásáról, valamint hatásmechanizmusáról még nem voltak adatok. Ezeket a kérdéseket *Xenopus* petesejtekben kifejezett egér K_{2P} csatornákon vizsgáltuk. A háttér K^+ áramot a korábbi kísérletekhez hasonlóan befelé irányuló áramként mértük magas (40 vagy 80 mM) K^+ -ot tartalmazó oldatban. A 16. ábra A paneljén jól látható, hogy a cloxyquin 100 μ M-os koncentrációban többszörösére aktiválta a TRESK áramot ($4,4 \pm 0,3$ -szoros aktiváció, $n=28$ pete; az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatom, $n=5$ pete). A cloxyquin általi aktiváció koncentráció függést mutatott (reprezentatív regisztrátum a 16. ábra B paneljén látható, $n=3$ pete), az EC_{50} 26,4 μ M volt (16. ábra C panel). A szer hatása reverzibilis volt (15 perc kimosás után az áram a stimulált érték $43,3 \pm 4,7\%$ -ára állt vissza, $n=5$ pete, az eredményt nem mutatom). A cloxyquin hatását a TRESK-en kívül a többi működőképes egér K_{2P} csatornán is meghatároztuk. Szelektivitási vizsgálatunkban a következő K_{2P} csatornákat fejeztük ki *Xenopus* petesejtekben: TWIK-2, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TALK-1, TREK-1, TREK-2, TRAAK, THIK-1 és TRESK. A vizsgált K_{2P} csatornák közül 100 μ M cloxyquin csak a TRESK áramot fokozta jelentősen. A TASK-2-t a cloxyquin kismértékben stimulálta ($1,24 \pm 0,09$ -szeres aktiváció, $n=7$ pete), a többi K_{2P} csatornára a szer viszont nem hatott vagy kismértékben gátolta áramukat. A cloxyquin tehát a K_{2P} családon belül csak a TRESK csatornára hat (a szelektivitással kapcsolatos eredményeket a 16. ábra D paneljén foglaltam össze).



16. ábra Az egér TRESK csatornát aktiválja a cloxyquin

A, *Xenopus* petesejteket egér TRESK csatornát kódoló cRNS-el injektáltunk. Injektálás után 2-3 nappal a petesejtek áramát két elektródos voltage clamp technikával mértük meg. Az áramot -100 mV-on mértük 4 másodpercenként ismétlődő feszültségprotokollal, a tartófeszültség 0 mV volt. Az EC [K⁺] 2 mM-ról 80 mM-ra változtattuk a görbék felett jelzett módon. A cloxyquin (100 μM) hozzáadását szintén a görbe felett jelöltük. A mért áramokat a cloxyquin ráadása előtt mért értékekre normalizáltuk. Eredményeinket átlag±standard hiba formájában ábrázoltuk (a felvételen látható görbe egy kísérlet, n=5 pete átlaga).

B, A cloxyquin és az egér TRESK koncentráció-hatás összefüggését az A panelben leírt módon határoztuk meg. A görbe felett jelöltük a fokozatosan emelkedő cloxyquin koncentrációk hozzáadását. Az adatokat átlag±standard hiba formájában ábrázoltuk (a felvételen látható görbe egy kísérlet, n=3 pete átlaga).

C, Az ábrán különböző cloxyquin koncentrációk (1 és 100 μM között) TRESK csatornát aktiváló hatását ábrázoltuk. A pontok 7-13 pete átlagát jelölik (a pontos számokat zárójelben adtuk meg). Az adatpontokat módosított Hill-egyenlettel illesztettük.

D, A cloxyquin az egér TRESK csatornát szelektíven aktiválja. Különböző K_{2P} csatornákat fejeztünk ki *Xenopus* petesejtekben. A cloxyquin hatását a befelé irányuló áramra 80 mM EC K⁺ esetén (TREK-1, TREK-2 és TRAAK esetén 40 mM) az A panelben leírt módon határoztuk meg (n=5-28 pete, a pontos elemszámot zárójelben adtuk meg). A normalizált adatokat átlag±standard hiba formájában, oszlopdiagrammként ábrázoltuk. A szaggatott vonal a cloxyquin hozzáadása előtti, a normalizálás alapját szolgáló értéket mutatja.

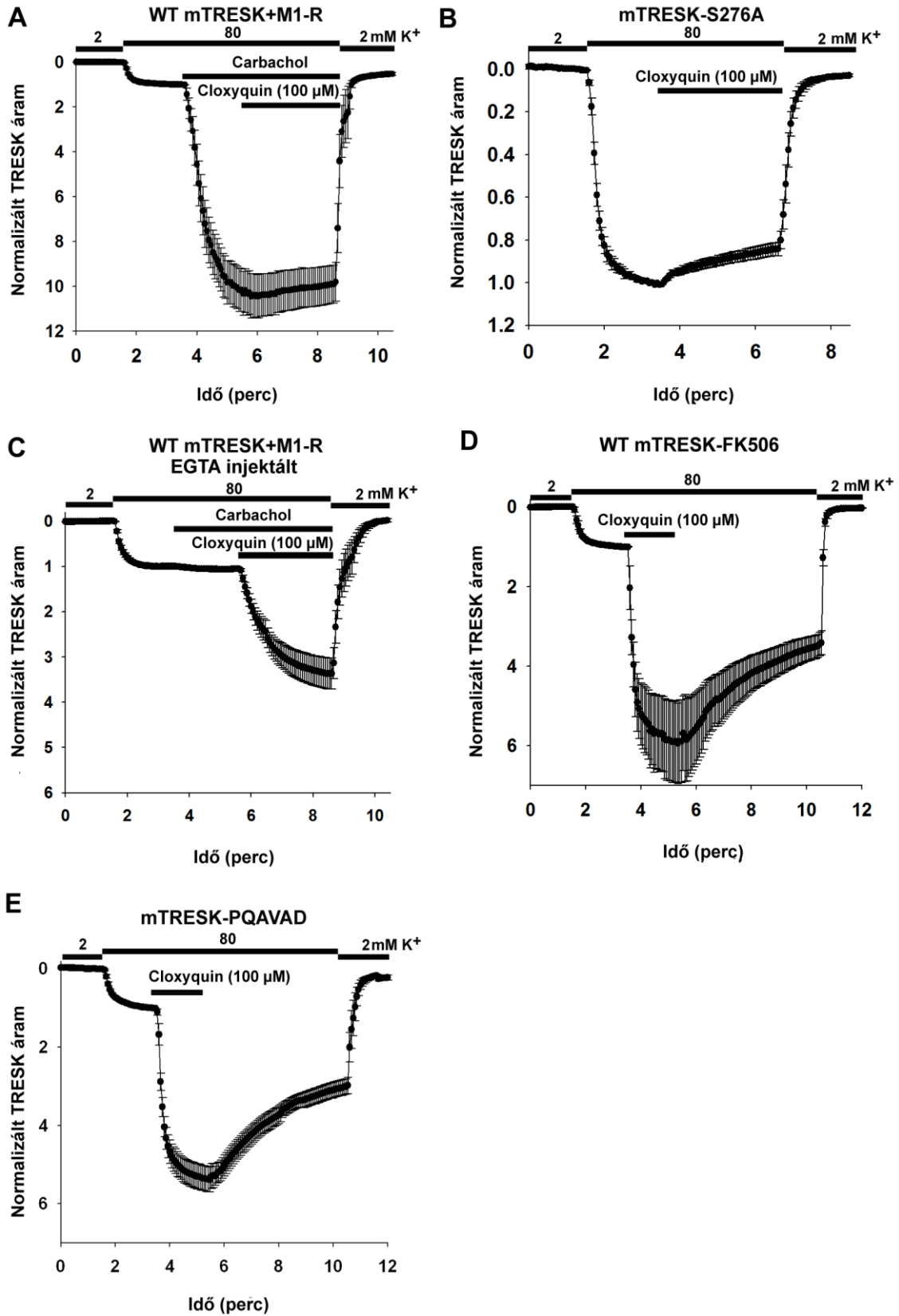
5.2.2. A cloxyquin hatása a kalciumtól és calcineurintól független

Kísérleti rendszerünkben a cloxyquin hatékonyabb aktivátora volt a TRESK csatornának, mint a cloxyquin TRESK áramot serkentő hatását először leíró cikkben. Az eredeti közleményben a TRESK csatornát U20S emlős sejt vonalban fejezték ki és csak kétszeres aktivációt tapasztaltak. Elképzelhetőnek tartottuk, hogy a cloxyquin általi stimuláció mértéke függ a csatorna aktivációs állapotától, így következő kísérletekben 100 μM cloxyquin hatását a kalcium-calcineurin útvonal farmakológiai befolyásolása után, illetve munkacsoportunk által korábban jellemzett módosított szabályozású mutáns TRESK csatornákon vizsgáltuk meg.

Első kísérletünkben egér TRESK csatornákat és M1-es ACh receptorokat együtt fejeztünk ki *Xenopus* petesejtekben. Korábbi eredményeinknek megfelelően a sejtek ingerlése carbachollal (1 μM) sokszorosára aktiválta a TRESK áramot (10,4 \pm 1,0-szoros aktiváció, n=9 pete, 17. ábra A panel). Ezt követően a cloxyquin az áramot nem aktiválta tovább. Eredményünk arra utalt, hogy a kalciumjel általi aktiváció olyan állapotba hozza a csatornát, ahol a cloxyquin már nem tudja tovább aktiválni azt. Ennek az eredménynek a megerősítésére megvizsgáltuk a cloxyquin hatását egy általunk korábban leírt konstitutívan aktív csatornán, az S276A mutánsra is. A 276-os szerin ugyanis a calcineurin elsődleges célpontja, ennek alaninra történő mutációja a defoszforilált (azaz aktivált) csatornát utánozza. Hasonlóan a kalciumjellel aktivált csatornához, a cloxyquin a S276A mutánst sem aktiválta, sőt az áram kismértékű gátlása volt megfigyelhető (14,9 \pm 3,0 % gátlás, n=11 pete, 17. ábra B panel). A cloxyquin tehát nem aktiválja a fokozott aktivitású TRESK csatornákat.

Az a tény, hogy a cloxyquin nem tudja tovább serkenteni a kalciumjel által aktivált TRESK áramot, felvetette azt a lehetőséget, hogy a cloxyquin a csatornát a kalcium-calcineurin útvonal befolyásolásán keresztül serkenti. A citoplazma kalcium koncentrációjának szerepét úgy vizsgáltuk meg, hogy M1 receptort és TRESK csatornát kifejező petesejteket mérés előtt HEPES-pufferelt EGTA oldattal (50-50 mM HEPES és EGTA) injektáltunk. A korábbi kísérletekben hatásos carbachol inger (1 μM) ezekben a petesejtekben nem serkentette a TRESK áramot, ami mutatja, hogy az injektált EGTA a citoplazmai kalciumot hatékonyan pufferezte. Az ezt követő cloxyquin ingerlés ennek ellenére fokozta a TRESK áramot (3,3 \pm 0,3-szorosra, n=12 pete, 17. ábra C panel).

Habár a stimuláció mértéke kisebb, mint az EGTA-val nem injektált petesejtek esetén, a különbség nem volt statisztikailag jelentős. A cloxyquin hatását tehát nem a citoplazmai kalcium szint változása közvetíti. A calcineurin esetleges közvetítő hatását a mérés előtt FK506-al előkezelt petesejteken vizsgáltuk (Az FK506 a calcineurin gátlószere, a használt koncentrációban megszüneteti a kalciumjel általi TRESK aktivációt). A cloxyquin általi aktiváció FK506 előkezelés után is megtartott volt ($5,3 \pm 0,7$ -szeres aktiváció, az 17. ábra D paneljén látható reprezentatív kísérlet $n=6$ pete átlaga). A calcineurin szerepe ellen szól az a tény is, hogy a munkacsoportunk által korábban leírt, calcineurint kötni nem tudó TRESK mutánst is aktiválta a cloxyquin ($5,4 \pm 0,7$ -szeres aktiváció, $n=6$ pete, 17. ábra E panel). A cloxyquin hatását tehát nem a citoplazmai kalciumszint és/vagy a calcineurin befolyásolásán keresztül fejti ki. A cloxyquin különböző körülmények között kifejtett hatását az egér TRESK csatornára a 18. ábrán foglaltam össze.



(az ábrát magyarázó szöveg a következő oldalon található)

17. ábra A cloxyquin hatását nem a calcium vagy calcineurin közvetíti

Xenopus petesejtekben vad típusú vagy különböző mutáns egér TRESK csatornákat fejeztünk ki. Az A és C panelek esetén M1 típusú acetil-kolin receptort is kifejeztünk a csatorna mellé. A kísérleti felállás valamint az eredmények ábrázolása a 21. ábra A paneljével megegyező módon történt.

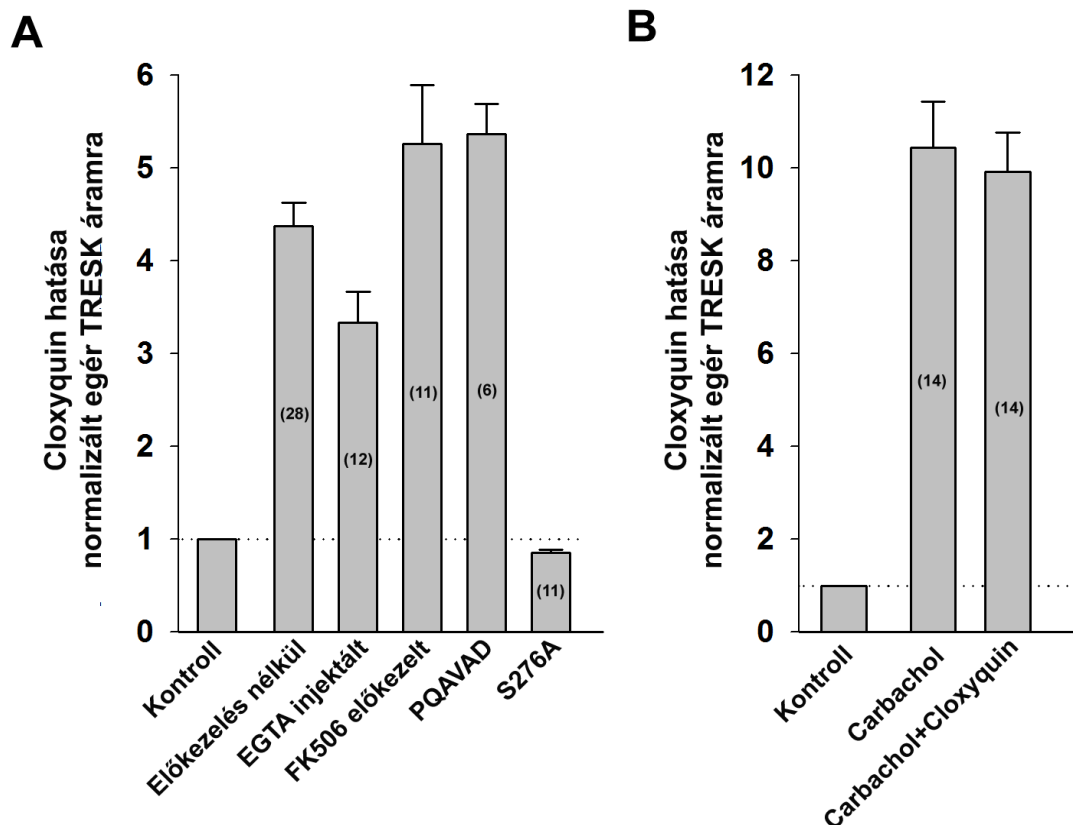
A, A cloxyquin nem aktiválja az egér TRESK áramot carbachol stimuláció után. Egér TRESK csatorát és M1 acetil-kolin receptort kifejező petesejteket carbachollal (1 μM), majd cloxyquinnel (100 μM) stimuláltunk, az ábra feletti jelzéseknek megfelelően (n=9 pete).

B, A cloxyquin nincs hatással a konstitutívan aktív S276A mutáns egér TRESK csatornára (n=6 pete).

C, A petesejtek EGTA-val való injektálása 2 órával a mérés előtt megakadályozza a csatorna M1 receptor általi aktivációját, a cloxyquin általi stimuláció viszont megmarad. Az EC K^+ változásait, a carbachol (1 μM) és cloxyquin (100 μM) hozzáadását a görbe fölött jelöltük (n=10 pete).

D, A calcineurin gátlása nem akadályozza meg a cloxyquin általi aktivációt. A petesejteket mérés előtt 2-3,5 órával a calcineurin gátló FK506-al (200 nM) kezeltük, majd a petesejteket 100 μM cloxyquinnel ingereltük (n=6 pete).

E, A cloxyquin (100 μM) serkenti a calcineurin kötésére képtelen PQAVAD egér TRESK mutáns áramát (n=6 pete).



18. ábra Különböző előkezelések és mutációk hatása a cloxyquin általi egér TRESK aktivációra

A, A különböző mérési körülmények, illetve mutációk hatását a cloxyquin TRESK áramot növelő hatására oszlopdiagrammként foglaltuk össze. A csoportok elemszámát az oszlopokon tüntettük fel. Az első oszlop, valamint a szagatott vonal a cloxyquin hozzáadása előtti normalizált áramot jelöli.

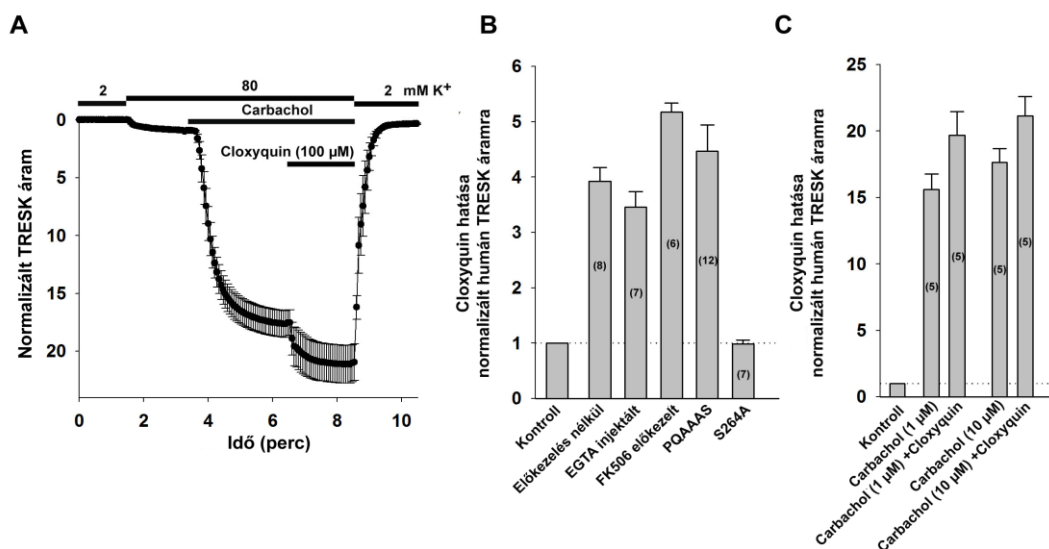
B, A carbachol (1 μ M), illetve a carbacholt követő cloxyquin (100 μ M) ingerlés hatását az egér TRESK áramra oszlopdiagrammként ábrázoltuk. Az egyes csoportok elemszámát az oszlopokon tüntettük fel. Az első oszlop, valamint a szagatott vonal a carbachol hozzáadása előtti értékre normalizált áramot jelöli.

5.2.3. A cloxyquin a humán TRESK csatornát is aktiválja

Az egér és a humán TRESK csatorna szabályozásában és farmakológiájában vannak eltérések (például csak a humán csatornát aktiválja a PKC, viszont érzéketlen Zn^{2+} -re). Ezért az egér ortológához hasonló megközelítéssel megvizsgáltuk a cloxyquin hatását az emberi TRESK csatornára is. A stimuláció mértéke és hatékonysága hasonló volt az egér TRESK-nél kapott eredményekhez.

Az egér TRESK esetén is használt 100 μM cloxyquin 3,9 \pm 0,3-szorosra aktiválta a humán TRESK áramot (n=8 pete), az EC_{50} értéke pedig 43,9 μM volt. Az egér S276A mutációnak megfelelő humán mutáns (S264A) esetén szintén nem hatott a cloxyquin (2 \pm 7% gátlás, n=7 pete). Ezzel szemben a cloxyquin mind EGTA injektálás (3,4 \pm 0,3-szoros aktiváció, n=7 pete), mind FK506 előkezelés (5,2 \pm 0,2-szeres aktiváció, n=6 pete), illetve a calcineurin kötőhelyet nem tartalmazó mutáns (PQAAAS, 4,5 \pm 0,5-szeres aktiváció, n=12 pete) esetén is fokozta a humán TRESK áramot. A kapott eredményeket az 19. ábra B paneljén foglalom össze.

Az egér TRESK csatorna esetén azt tapasztaltuk, hogy kalcium jel általi aktiváció után a cloxyquin nincs hatással a TRESK áramra. Ezzel szemben a humán TRESK csatornát a cloxyquin kismértékben stimulálta 1 μM carbachol általi előzetes aktiváció után is (a carbachol 15,59 \pm 1,17-szeresre fokozta az áramot, a cloxyquin pedig ehhez a stimulált értékhez képest 1,25 \pm 0,03-szorosra aktivált, n=5 pete). Annak kizárására, hogy ez az aktiváció annak a következménye, hogy nem volt teljes a TRESK kalcium általi stimulációja, megismételtük a kísérletet magasabb carbachol koncentrációval (10 μM) is. Ebben a felállásban mind a carbachol által aktiváció (17,60 \pm 1,03-szoros, n=5 pete), mind a cloxyquin áramot stimuláló hatása (1,20 \pm 0,01-szoros aktiváció, n=5 pete, 19. ábra A panel) hasonló volt, mint a kisebb carbachol koncentráció esetén. A carbachol, valamint a carbachol és cloxyquin együttes alkalmazásakor kapott eredményeket az 19. ábra C paneljén mutatom.



19. ábra A humán TRESK csatornát aktiválja a cloxyquin

Xenopus petesejtekben vad típusú vagy különböző mutáns egér TRESK csatornákat fejztünk ki. Azon kísérletek esetén, ahol karbachollal is stimuláltuk a petesejteket, M1 típusú acetil-kolin receptort is fejztünk ki a csatorna mellé. A kísérleti protokoll hasonló volt a 23. ábránál használt protokollhoz.

A, Humán TRESK csatornákat és M1-es receptorokat együtt fejztünk ki *Xenopus* petesejtekben. A calcium/calcineurin útvonalat 10 μM carbachollal aktiváltuk (n=5 pete). A cloxyquin a human csatornát carbachol általi aktiváció után is aktiválta.

B, A különböző előkezelések, illetve mutációk hatását a human TRESK csatorna cloxyquin (100 μM) általi aktivációjára oszlopdiagramm formájában foglaltuk össze. A csoportok elemszámát az oszlopokon tüntettük fel. Az első oszlop, valamint a szagatott vonal a cloxyquin hozzáadása előtti normalizált áramot jelöli.

C, A carbachol (1 vagy 10 μM), illetve a carbacholt követő cloxyquin (100 μM) ingerlés hatását a humán TRESK áramra oszlopdiagrammként ábrázoltuk. Az egyes csoportok elemszámát az oszlopokon tüntettük fel. Az első oszlop, valamint a szagatott vonal a cloxyquin hozzáadása előtti értékre normalizált áramot jelöli.

5.2.4. Az egér TRESK F156,364A mutáns csatorna konstitutívan aktív

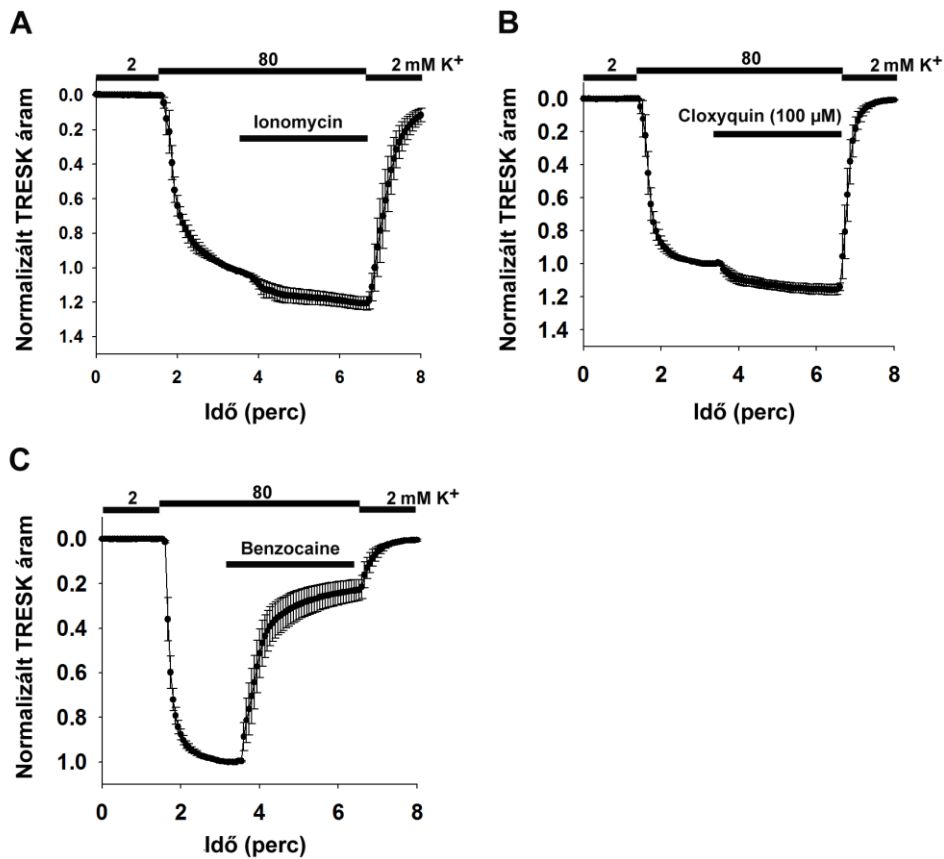
Egy korábbi, az egér TRESK csatornát vizsgáló közleményben két, a pórásban található fenilalanin aminosav (F156, F364) szerepét írták le a csatornát gátló quinine, lidocaine és bupivacaine kötésében. Ezen aminosavak alaninra történő mutációja megszüntette a gátlószerek hatását a csatornára. A kettős mutáns csatorna létrehozása után részletesebben jellemeztük a csatorna farmakológiai tulajdonságait. A kalcium ionofór ionomycin a vad típusú TRESK csatornát sokszorosára serkenti a kalcium/calcineurin útvonal aktivációján keresztül.

Ezzel szemben a kettős mutáns csatorna csaknem teljesen érzéketlen volt 0,5 μM ionomycinre ($1,21 \pm 0,04$ -szeres aktiváció, $n=5$ pete, 20. ábra A panel). Ez az eredmény arra utalhat, hogy a pórusban található nagyméretű aromás aminosavak lecserélése egy magasabb alapaktivitású csatornát eredményez, mint a vad típusú csatorna. Feltételezésünket úgy igazoltuk, hogy *Xenopus* petesejteket azonos mennyiségű (0,4 ng RNS/pete) vad típusú, illetve kettős mutáns csatorna RNS-el injektáltunk. Elképzelésünknek megfelelően a kettős mutáns csatorna árama jelentősen nagyobb volt, mint a vad típusú csatornájé (kettős mutáns: $3,2 \pm 0,5$ μA , vad típusú mTRESK: $0,65 \pm 0,1$ μA , $n=6-6$ petesejt). A kettős mutáns csatornát aktív állapotának megfelelően jelentősen gátolta 1 mM benzocaine ($77,1 \pm 4,7\%$ gátlás, $n=5$ pete, 20. ábra C panel), míg a vad típusú, nem aktivált csatorna áramát korábbi eredményeinknek megfelelően a benzocaine nem befolyásolta. Korábbi eredményeinknek megfelelően a kettős mutáns csatornát a cloxyquin gyakorlatilag nem aktiválta ($1,14 \pm 0,02$ -szeres aktiváció, $n=5$ pete, 20. ábra B panel).

5.2.5. A cloxyquin aktiválja a DRG idegsejtek háttér káliumáramát

A DRG neuronok nagy mennyiségben kifejezik a TRESK csatornát, így a cloxyquin alkalmazhatóságát a TRESK áram natív sejtekben való kimutatására izolált DRG idegsejteken vizsgáltuk.

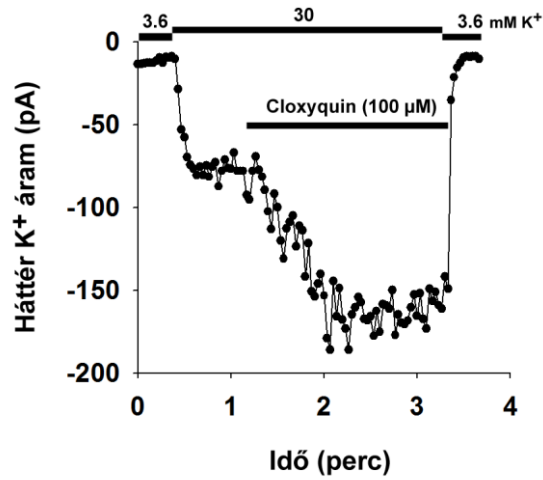
Annak biztosítására, hogy a TRESK csatornát ne aktiválja a Ca^{2+} /calcineurin útvonal a teljes sejtes patch clamp mérések előtt, a sejteket a mérést megelőző éjszaka calcineurin gátlószerrel kezeltük (1 μM cyclosporin A). Az alkalmazott feszültségprotokollunk tartalmazott egy depolarizáló rámpát, így idegsejtek esetén feszültségfüggő befelé irányuló áramokat is mértünk. Azon sejteket ahol nem láttunk befelé irányuló feszültségfüggő áramokat, kihagytuk az értékelésből. Összesen 20 DRG idegsejtet értékeltünk ki, ezek közül 8 idegsejt háttér K^+ áramát fokozta 100 μM cloxyquin ($41,1 \pm 9,7\%$ -al, reprezentatív mérés a 21. ábrán látható), tehát a DRG idegsejtek egy részében a TRESK hozzájárul a háttér K^+ áramhoz.



20. ábra Az egér TRESK F156A, F364A mutánsa konstitutívan aktív

Xenopus petesejtekben kifejeztük az egér TRESK csatorna F156A, F364A mutánsát. A mérési körülmények, illetve az ábrázolás az 21. ábra A paneljével azonos módon történtek (csoportonként n=5 pete). A különböző anyag hozzáadását a görbék felett jeleztük.

- A, A kettős mutáns csatornát a calcium ionofór ionomicinnel ingereltük (0.5 μM).
- B, A kettős mutáns csatornát cloxyquinnel ingereltük (100 μM).
- C, A kettős mutáns csatorna áramát gátolja a benzocaine (1 mM).



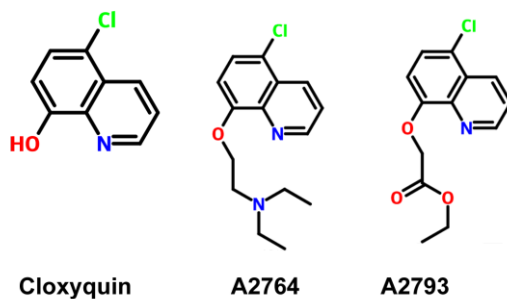
21. ábra A cloxyquin aktiválja a DRG neuronok háttér káliumáramát

A reprezentatív felvételen egy cloxyquin ingerlésre válaszoló idegsejt háttér káliumárama látható. Az áramot -100 mV-os feszültséglépés végén mértük, a tartófeszültség -80 mV volt. Az EC $[K^+]$ változásait és a cloxyquin (100 μ M) hozzáadását a görbe felelő jelöltük.

5.3 Cloxyquin származékok hatása a TRESK csatornára

5.3.1. Az A2793 az egér TRESK állapotfüggő gátlószere

A cloxyquinről doktori munkám során igazoltam, hogy a TRESK csatorna szelektív, de viszonylag alacsony affinitású ($EC_{50}=26,4 \mu\text{M}$) aktivátora. A csatorna aktivitásának *in vivo* módosításához azonban (mind állatkísérletekben, mind egy esetleges új gyógyszermolekula esetén) ennél lényegesen magasabb affinitású szerekre lenne szükség. Ezért a Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetével (Prof. Mátyus Péter és munkatársai) együttműködve 28 új cloxyquin (vagy a cloxyquin szerkezetéhez hasonló) származékot állítottunk elő, majd megvizsgáltuk az új vegyületek hatásait *Xenopus* petesejtekben kifejezett K_{2P} csatornákon. A vizsgált 28 vegyület közül 10 nem befolyásolta az egér TRESK áramot. Hét vegyület aktiválta a TRESK csatornát, azonban affinitásuk hasonló volt a cloxyquinéhez és más K_{2P} csatornák áramát is befolyásolták. Tizenegy vegyület gátolta a TRESK áramot, a két legígéretesebb gátlószert tulajdonságait (potenciáját, specificitását) részletesen megvizsgáltuk. Az A2764 és A2793 szerkezeti képlete a 22. ábrán látható.

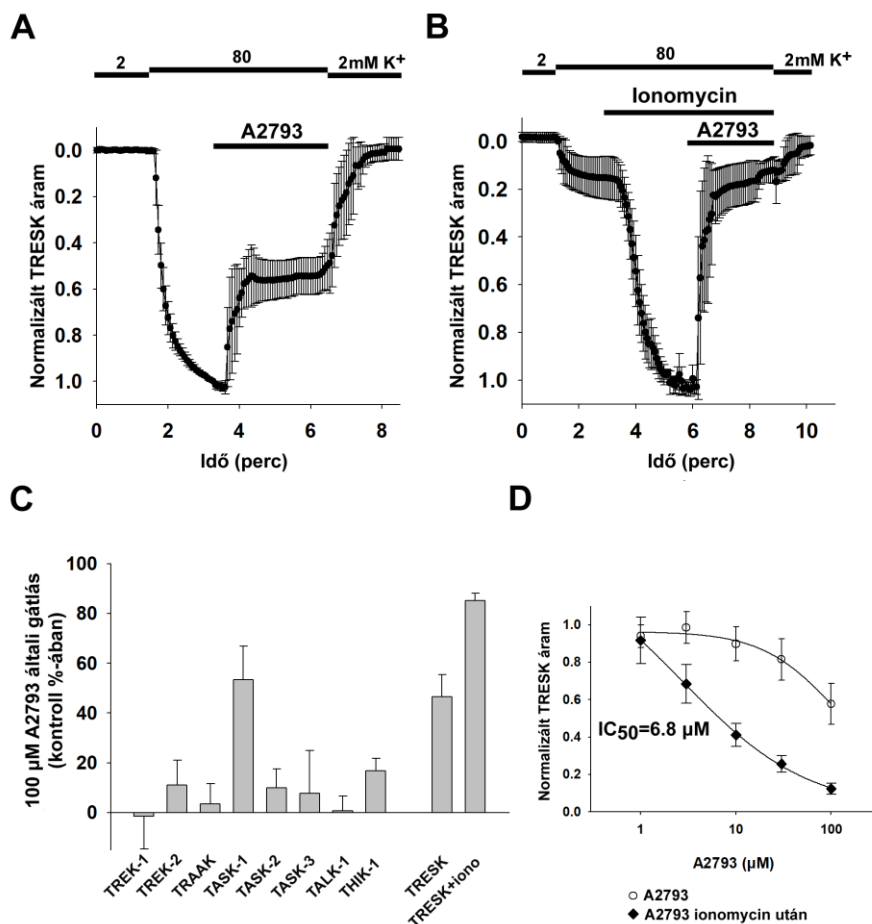


22. ábra A gátló hatású cloxyquin analógok szerkezeti képlete

Az ábrán az általunk részletesen vizsgált két új cloxyquin származék, valamint a cloxyquin képletét mutatom.

Az egér TRESK áramot $100 \mu\text{M}$ A2793 $43,0 \pm 8,9$ %-al gátolta (23. ábra A panel). Ha a csatornákat a gátlószert hozzáadása előtt $0,5 \mu\text{M}$ ionomycinnel aktiváltuk, a gátlás mértéke $85,5 \pm 2,9$ % volt (23. ábra B panel), ami jelentősen magasabb az alapállapotú TRESK esetén kapott gátláshoz képest ($p < 0,05$, Mann-Whitney U próba).

Az A2793 koncentráció-hatás összefüggését meghatároztuk nyugvó és aktivált TRESK áram esetén, az aktivált csatorna esetén az A2793 affinitása körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb volt (23. ábra D panel). Az A2793 tehát az aktivált TRESK csatornát hatékonyabban gátolja, mint az alapállapotban lévő. Az A2793 hatását a TRESK mellett az alábbi K_{2P} csatornákon vizsgáltuk meg: TASK-1, TASK-2, TASK-3, TALK-1, TREK-1, TREK-2, TRAAK, THIK-1 és TRESK. A TRESK mellett $100 \mu\text{M}$ A2793 a TASK-1 áramot is gátolta ($53,4 \pm 13,5\%$ gátlás, $n=5$ petesejt), a többi csatorna áramát kevésbé befolyásolta (23. ábra C panel). Az A2793 így tehát csak olyan natív sejtekben használható a TRESK azonosítására, ahol nem fejeződik ki a TASK-1 csatorna. A DRG idegsejtekről ismert, hogy kifejezik a TASK-1 csatornát, így az A2793 nem alkalmas a TRESK azonosítására DRG idegsejteketben.



23. ábra az A2793 az egér TRESK és TASK-1 gátlószere

A, *Xenopus* petesejteket egér TRESK csatornát kódoló cRNS-el injektáltunk. Az injektálás után 2-3 nappal a petesejt áramát két elektródos voltage clamp technikával mértük meg. Az áramot -100 mV -on mértük 4 másodpercenként ismétlődő feszültségprotokollal, a tartófeszültség 0 mV volt. Az EC [K^+] 2 mM -ról 80 mM -ra változtattuk a görbék felett jelzett módon. Az A2793 ($100 \mu\text{M}$) hozzáadását szintén a görbe felett jelöltük.

A mért áramokat az A2793 ráadása előtt mért értékekre normalizáltuk. Eredményeinket átlag±szórás formájában ábrázoltuk (az ábrán látható görbe n=5 pete átlaga).

B, Az A2793 hatását az aktivált egér TRESK-re az A panelben leírt módon határoztuk meg. A TRESK áramot ionomycin (0,5 μM) hozzáadásával aktiváltuk, az aktiváció mértéke 6,7±2,0-szoros volt. Az adatokat az analóg ráadása előtt mért értékekre normalizáltuk. Eredményeinket átlag±szórás formájában ábrázoltuk (az ábrán látható görbe n=5 pete átlaga)

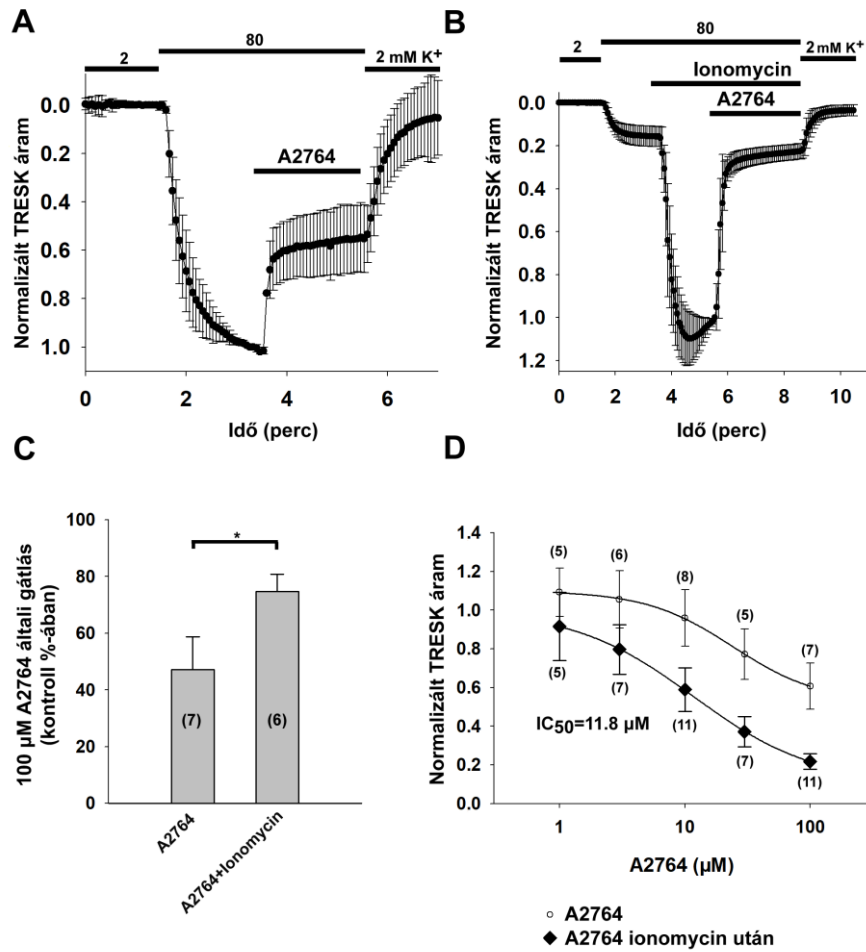
C, Különböző $\text{K}_{2\text{P}}$ csatornákat fejeztünk ki *Xenopus* petesejtekben. Az A2793 hatását az A panelben leírt módon határoztuk meg (n=5 pete csatorna típusonként). Az adatokat átlag±szórás formájában, oszlopdiagrammként ábrázoltuk.

D, Az ábrán különböző A2793 koncentrációk (1 és 100 μM között) nyugalmi állapotban lévő, valamint aktivált egér TRESK csatornát gátló hatását ábrázoltuk. A pontok 5 pete átlagát jelölik. Az adatpontokat módosított Hill-egyenlettel illesztettük.

5.3.2. Az A2764 az egér TRESK áram szelektív, állapotfüggő gátlószere

A másik általunk részletesen vizsgált gátló vegyület, az A2764 (100 μM koncentrációban használva) az egér TRESK áramot 42,8±11,5%-al gátolta (n=7 petesejt, 24. ábra A panel). Az A2793-hoz hasonlóan az A2764 is nagyobb mértékben gátolta az ionomycinnel (0,5 μM) aktivált TRESK áramot, ekkor a gátlás mértéke 77,8±3,5% volt (n=6 petesejt, 24. ábra B panel). A gátlás mértéke jelentősen magasabb volt az aktivált csatornák esetén az alapállapotú TRESK esetén kapott gátláshoz képest (24. ábra, C panel p<0,05, Mann-Whitney U próba). Az A2764 koncentráció-hatás összefüggését az A2793 esetén ismertetett módon meghatároztuk nyugvó és aktivált TRESK áram esetén. Az A2764 esetén is nagyobb volt a gátlószere potenciája az aktivált csatorna esetén (24. ábra D panel). Az A2764 tehát szintén a TRESK csatorna állapotfüggő gátlószere.

Az A2764 szelektivitását a $\text{K}_{2\text{P}}$ alcsaládon belül ugyanazokon a $\text{K}_{2\text{P}}$ csatornákon vizsgáltuk, mint amiket az A2793 esetén már felsoroltam. Az A2764 a vizsgált $\text{K}_{2\text{P}}$ csatornák közül a TREK-1 és (az idegsejtekben egyébként egyáltalán nem kifejeződő) TALK-1 áramait körülbelül 20%-ban, a többi $\text{K}_{2\text{P}}$ csatornát pedig még ennél is kisebb mértékben gátolta (ld. 25. ábra). Az A2764 szelektivitási profilja tehát kedvezőbb, mint az A2793-é, úgyhogy ezzel a vegyülettel folytattuk vizsgálatainkat DRG idegsejteken.



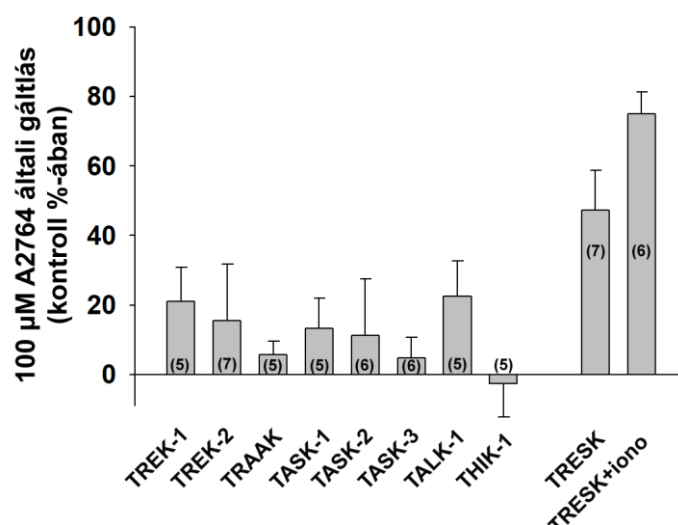
24. ábra Az A2764 az egér TRESK állapotfüggő gátlószere.

A, Az A2764 hatását az egér TRESK-re a 28. ábra A paneljén leírt módon határoztuk meg és ábrázoltuk (az ábrán látható görbe n=7 pete átlaga).

B, Az A2764 hatását az aktivált egér TRESK-re a 28. ábra B paneljén leírt módon határoztuk meg. Az ionomycin általi aktiváció $7,1 \pm 1,8$ -szoros volt. Adatainkat az analóg ráadása előtt mért értékekre normalizáltuk. Eredményeinket átlag \pm szórás formájában ábrázoltuk (az ábrán látható görbe n=6 pete átlaga).

C, Az A és B paneleken látható eredményeket oszlopdiagramm formájában ábrázoltam átlag+szórás formájában, a csoportok elemszámát zárójelben adtam meg. A gátlás mértéke statisztikailag szignifikáns volt.

D, Az ábrán különböző A2764 koncentrációk (1 és 100 μM között) nyugalmi állapotban lévő, valamint aktivált egér TRESK csatornát gátló hatását ábrázoltuk. A pontok 5-11 pete átlagát jelölik (a pontos számokat zárójelben adtuk meg). Az adatpontokat módosított Hill-egyenlettel illesztettük.



25. ábra Az A2764 az egér TRESK szelektív gátlószere

Különböző K_{2P} csatornákat fejeztünk ki *Xenopus* petesejtekben. Az A2764 hatását a befelé irányuló áramra 80 mM EC K^+ esetén (TREK-1, TREK-2 és TRAAK esetén 40 mM) az előző, 29. ábrán leírt módon határoztuk meg (n=5-7 pete, a pontos elemszámot zárójelben adtuk meg). Az adatokat átlag+szórás formájában, oszlopdiaagrammként ábrázoltuk.

5.3.3. Az A2764 DRG idegsejtekben gátolja a TRESK áramot

Az A2764 hatását izolált DRG idegsejtek háttér káliumáramára teljes sejtes patch clamp mérésekkel vizsgáltuk. A TRESK állapota befolyásolja az A2764 általi gátlás mértékét, ezért a mérések előtt 0,5 μ M ionomycin hozzáadásával aktiváltuk a csatornákat. Az A2764 mellett vizsgáltuk a háttér káliumáram ruténium vörös (RR) érzékenységét is. A gátlószereket (100 μ M A2764 és 30 μ M RR) egymást követően adtuk rá az idegsejtekre. A 26. ábra A paneljén egy vad típusú egerből származó, A2764-re érzékeny idegsejtről készült reprezentatív felvétel látható. A vizsgált vad típusú neuronok A2764- és RR érzékenységét pontdiagrammként ábrázoltuk a 26. ábra B paneljén. Látható, hogy 6 idegsejt esetén a háttér káliumáram több, mint 40%-a érzékeny volt A2764-re, a másik 4 idegsejt esetén a gátlás mértéke 20% alatt volt. Az A2764- és RR-érzékeny áram nagysága között negatív korreláció volt megfigyelhető ($r=-0.9499$, $p<10^{-4}$, Pearson-féle korreláció analízis). A két gátlószer együttes alkalmazása a háttér káliumáramot a kontroll érték $16\pm 2,9\%$ -ára csökkentette, tehát a háttér káliumáramért ezekben az idegsejtekben elsősorban A2764- és RR- érzékeny csatornák felelősek.

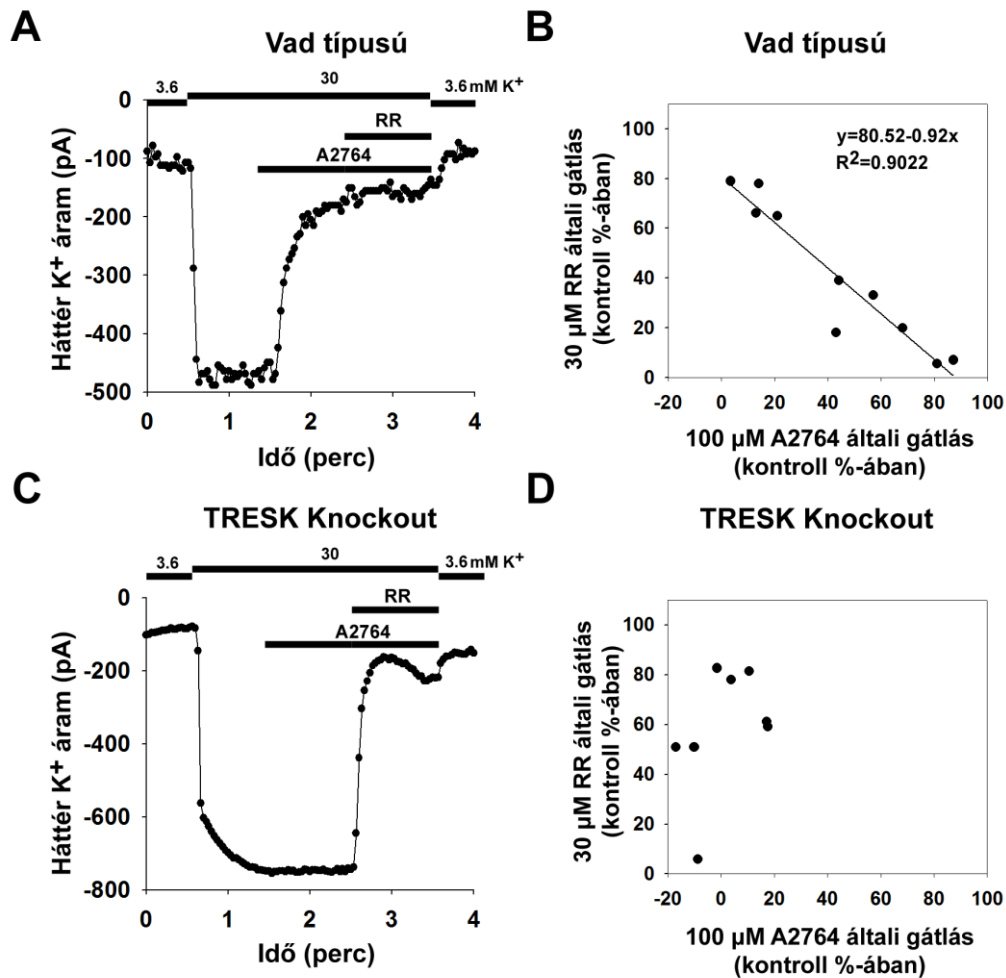
Az A2764 és RR hatását megvizsgáltuk TRESK génhiányos (TRESK KO) egerekből izolált DRG idegsejtek esetén is. A kísérleti körülmények teljes mértékben megegyeztek a vad típusú egerekből származó DRG idegsejtek esetén használtakkal. Amint a 26. ábra C paneljén látható reprezentatív felvételen látható, a TRESK KO idegsejt háttér káliumáramára nem hatott az A2764, míg a RR jelentős gátló hatása volt megfigyelhető. Eredményeinket a 26. ábra D paneljén foglalom össze, jól látható, hogy az A2764 hatása a háttér káliumáramra ($6,5 \pm 15,8\%$ gátlás, $n=8$ idegsejt) lényegesen kisebb volt, mint amit a vad típusú idegsejtek esetén tapasztalhattunk ($43,0 \pm 29,7\%$ gátlás, $n=10$ idegsejt). Ez az eredmény arra utal, hogy a vad típusú DRG idegsejtekben megfigyelt A2764-érzékeny áram valóban a TRESK áramnak felel meg, tehát az A2764 alkalmas a TRESK gátlására primer sejtekben is.

5.3.4. Az A2764 fokozza a DRG idegsejtek ingerlékenységét

Az A2764 hatását izolált DRG idegsejtek nyugalmi membránpotenciáljára a patch clamp technika current clamp felállításában vizsgáltuk. Vad típusú DRG neuronok esetében $100 \mu\text{M}$ A2764 hatására depolarizálódtak a sejtek, a depolarizáció mértéke $6,6 \pm 1,6 \text{ mV}$ volt (A2764 előtt: $-57,3 \pm 2,1 \text{ mV}$, A2764 után: $-50,7 \pm 3,3 \text{ mV}$) a különbség statisztikailag szignifikáns volt ($p < 0,05$, egymintás t-próba, $n=15$ idegsejt, reprezentatív felvételért ld. a 32. ábra A panel közepső felvételét). TRESK KO DRG idegsejtek esetén az A2764 nem befolyásolta az idegsejtek nyugalmi membránpotenciálját (A2764 előtt: $-55,8 \pm 2,2 \text{ mV}$, A2764 után $-55,0 \pm 2,3 \text{ mV}$, $n=13$ idegsejt, 32. ábra B panel), ami arra utal, hogy a depolarizáció a TRESK csatorna gátlásának következménye volt. Eredményeinket a 33. ábra A paneljén foglalom össze.

Az A2764 hatását az idegsejtek ingerlékenységére szintén a current clamp technikával határoztuk meg. Izolált DRG idegsejtek reobázisát fokozatosan növekvő áramimpulzusok segítségével határoztuk meg A2764 hozzáadása előtt és után. Vad típusú idegsejtek esetében A2764 hatására csökkent az akciós potenciál kiváltásához szükséges stimulus nagysága (A2764 előtt: $500 \pm 85 \text{ pA}$, A2764 után: $350 \pm 61 \text{ pA}$, $n=6$ idegsejt, $p < 0,05$, egymintás t-próba, reprezentatív felvétel a 32. ábra A paneljén látható).

Ezzel szemben a TRESK KO DRG idegsejtek esetén az A2764 hatására nem volt változás a reobázis nagyságában (A2764 előtt: 320 ± 58 pA, A2764 után: 360 ± 60 pA, $n=5$ idegsejt, 32. ábra B panel). A DRG idegsejtek reobázisával kapcsolatos eredményeinket a 33. ábra B paneljén foglalom össze.



26.ábra Az A2764 gátolja a DRG neuronok háttér káliumáramát

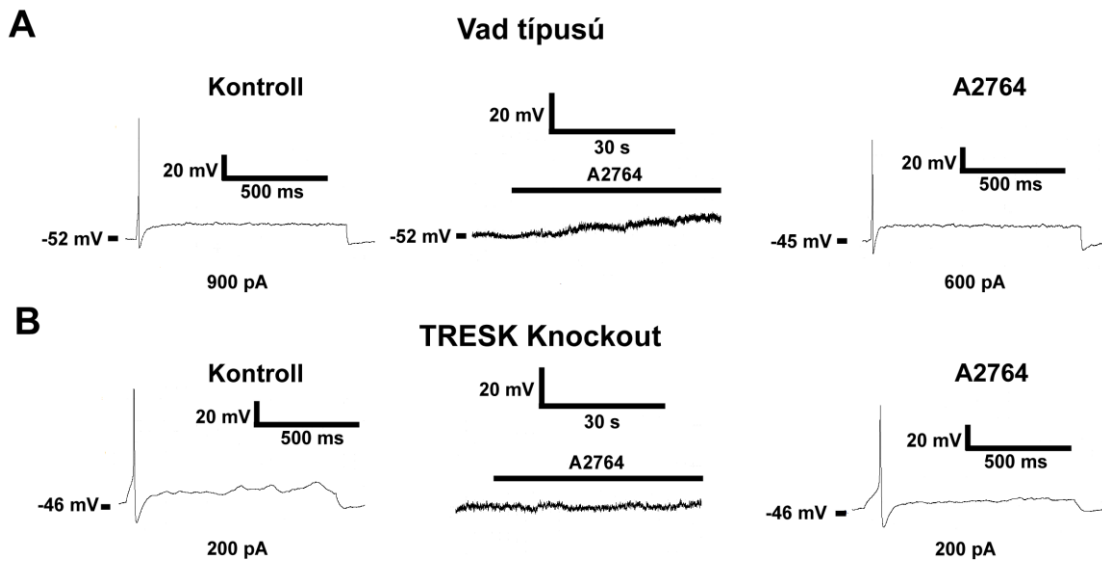
Vad típusú vagy TRESK génhíányos (TRESK KO) egerekből DRG idegsejteket izoláltunk. Az áramot -100 mV-os feszültséglépés végén mértük, a tartófeszültség -80 mV volt. Az EC [K⁺] változásait (3,6 vagy 30 mM), az A2764 (100 μM) és a RR (30 μM) hozzáadását a görbe felett jelöltük. A fürdőoldat 0,5 μM ionomycint tartalmazott.

A, A reprezentatív felvételen egy A2764-re érzékeny, vad típusú idegsejt háttér káliumárama látható.

B, Az A2764 és RR hatását a háttér K⁺ áramra 10 vad típusú DRG idegsejt esetén határoztuk meg, a gátlószerek hatását pontdiagrammként ábrázoltuk. Az adatpontokon lineáris regressziót végeztünk, a regressziós egyenest is mutatom az ábrán (a hozzátartozó egyenlettel és R értékkel együtt).

C, A reprezentatív felvételen egy TRESK KO idegsejt háttér káliumárama látható.

D, Az A2764 és RR hatását a háttér K⁺ áramra 8 TRESK KO DRG idegsejt esetén határoztuk meg, a gátlószerek hatását pontdiagrammként ábrázoltuk.



32. ábra Az A2764 fokozza a DRG idegsejtek ingerlékenységét a TRESK gátlásán keresztül

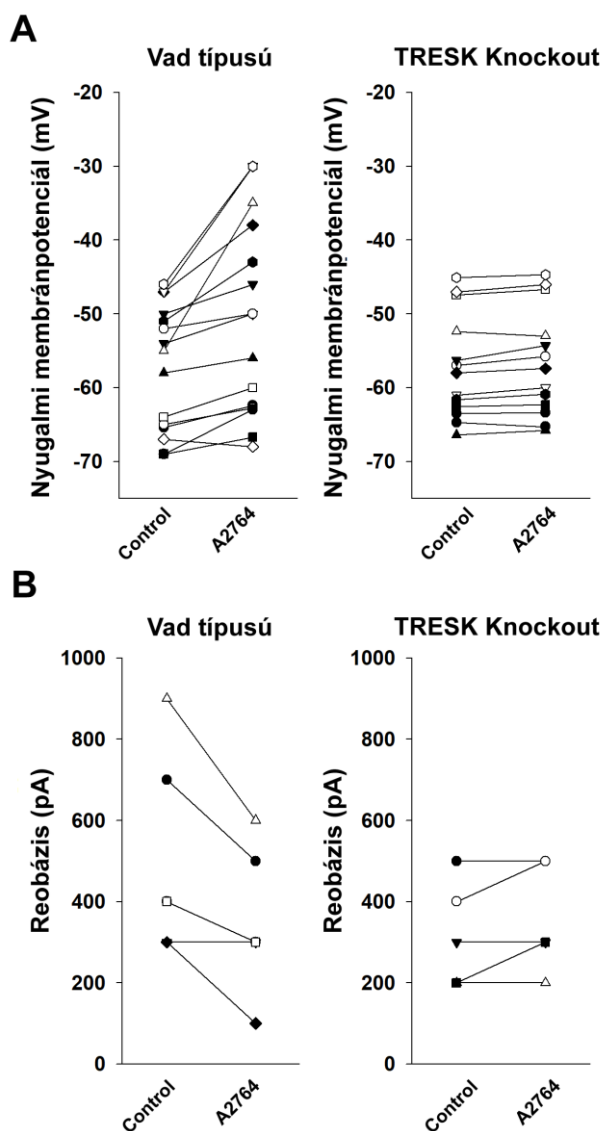
Vad típusú vagy TRESK génhiányos (TRESK KO) egerekből DRG idegsejteket izoláltunk. A reobázist current clamp technikával, depolarizáló áramimpulzusok segítségével határoztuk meg A2764 hozzáadása előtt és után. Az A2764 hatását a nyugalmi membránpotenciálra current clamp üzemmódban, áramimpulzus leadása nélkül határoztuk meg ("I=0" üzemmód).

A, Az ábrán egy vad típusú DRG idegsejtről készült reprezentatív felvétel látható. Bal és jobb panel: Az első olyan felvétel látható, ahol az áramimpulzus akciós potenciál kialakulásához vezetett (A2764 hozzáadása előtt és után).

Középső panel: Az A2764 hozzáadását a görbe feletti vonal jelöli. Látható, hogy A2764 hatására depolarizálódik az idegsejt.

B, Az ábrán egy TRESK KO DRG idegsejtről készült reprezentatív felvétel látható. Bal és jobb panel: Az első olyan felvétel látható, ahol az áramimpulzus akciós potenciál kialakulásához vezetett (A2764 hozzáadása előtt és után).

Középső panel: Az A2764 hozzáadását a görbe feletti vonal jelöli. Látható, hogy A2764 hatására nem változik az idegsejtek membránpotenciálja.



33. ábra Összefoglaló az A2764 hatásairól vad típusú és TRESK KO DRG neuronok esetén

A, Összesen 15 vad típusú (bal panel) és 13 TRESK knockout (jobb panel) DRG neuron nyugalmi membránpotenciál értékét határoztuk meg A2764 (100 μ M) hozzáadása előtt (Kontroll) és után (A2764). Az egy idegsejthez tartozó adatpontokat egyenes vonallal kötöttük össze.

B, Összesen 6 vad típusú (bal panel) és 5 TRESK knockout (jobb panel) DRG neuron reobázis értékét határoztuk meg A2764 (100 μ M) hozzáadása előtt (Kontroll) és után (A2764). Az egy idegsejthez tartozó adatpontokat egyenes vonallal kötöttük össze.

6. Megbeszélés

6.1. A különböző TREK alegységek működőképes heterodimereket képeznek

A K_{2P} csatornacsaládban több alegységről is ismert volt munkánk kezdetén, hogy más alegységekkel működőképes heterodimer csatornákat hoznak létre. Ezek a heterodimer csatornák tulajdonságaikban eltérnek az őket alkotó alegységek homodimer csatornáitól, így a háttér káliumáram tulajdonságainak pontosabb szabályozását, „finomhangolását” teszik lehetővé. A TREK alcsaládba tartozó TREK-1 és TREK-2 csatornák több fontos tulajdonságukban (pl. vezetőképesség, EC pH-érzékenység) eltérnek egymástól, valamint kifejeződési mintázatuk is átfed (pl. DRG neuronok, kisvérköri simaizomsejtek). Tekintettel arra, hogy a két alegység egy alcsaládba tartozik és a funkcionális különbségek ellenére hasonló szerkezetűek, felmerült bennünk annak a lehetősége, hogy ezek az alegységek működőképes heterodimer csatornát alkothassanak.

A feltételezett TREK-1/TREK-2 heterodimer modellezésére létrehoztunk olyan mesterséges csatornát, ahol a két alegységet molekuláris biológiai módszerekkel egymáshoz kapcsoltuk („Tandem” csatorna). Ez a tandem csatorna a két alegység tulajdonságait aszimmetrikusan örökölte, az EC pH-csökkenésre és spadinra való érzékenységében a TREK-1-hez hasonlított. A TREK-2 homodimer teljes mértékben érzéketlen spadinra, így ez az eredmény azt mutatja, hogy a spadin-érzékenységhez elegendő az, hogy ha egy TREK-1 alegység található a dimerben. A tandemcsatorna egyedi csatorna vezetőképessége és ruténiumvörös (RR) érzékenysége viszont a két homodimer csatorna esetén mért értékek közé esett. Az a jelenség, miszerint a heterodimer csatorna vezetőképessége a homodimer csatornák vezetőképessége közé eső értéket vesz fel, más K_{2P} csatorna heterodimereknél (pl. THIK-1/THIK-2 heterodimer, TASK-1/TASK-3 heterodimer Mg^{2+} -mentes közegben) is ismert (176, 160). A csatorna közepes RR-érzékenysége jól összecseng azon korábbi eredményünkkel, miszerint a TREK-2 RR-érzékenységéhez szükség van a dimerben mindkét, a RR-kötésben részt vevő aszpartát aminosav jelenlétéhez (85). Ha heterológ rendszerekben (*Xenopus* petesejtek, HEK293T sejtek) együtt fejeztük ki a TREK-1 és TREK-2 alegységeket, a kapott áram pH- és RR-érzékenysége nem volt magyarázható kizárólag TREK-1 és TREK-2 homodimereknél keletkezésével, ami arra utal, hogy a homodimereknél mellett TREK-1/TREK-2 heterodimer is keletkezett. A heterodimer létrejöttét biokémiai módszerekkel és egyedi csatorna mérésekkel is igazoltuk.

Munkacsoportunkkal közel egyidőben mások is beszámoltak arról, hogy a TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimereket képeznek heterológ expressziós rendszerekben (172, 180). Eredményeik nagyrészt megegyeztek az általunk leírt eredményekkel, annak ellenére, hogy más módszereket (pl. fluoreszcens rezonancia energiatranszfer mérések, proximitás ligációs vizsgálat, egyedi molekula pulldown kísérletek) és expressziós rendszereket (MDCK sejtek) használtak. Új eredmény a mi vizsgálatainkhoz képest, hogy megvizsgálták és kimutatták, hogy az alcsalád 3. tagja, a TRAAK alegység is működőképes heterodimert alkot a TREK-1 vagy TREK-2 alegységgel. Ezen eredmények alapján tehát úgy tűnik, hogy az alcsaládon belüli heterodimerizáció általános tulajdonsága a TREK csatornáknak, a lehetséges nagyszámú heterodimer kombináció pedig a primer sejtekben mérhető háttér káliumáram tulajdonságának rendkívül összetett szabályozását teszi lehetővé.

A TREK-1 és TREK-2 alegységek egyaránt kifejeződnek a DRG idegsejtekben, így adott a lehetőség, hogy a heterodimer csatorna létrejöjjön ezekben az idegsejtekben. A DRG idegsejtekből kitépelt membránfoltokban talált káliumcsatornák egy jelentős része (9 csatorna a 21-ből) érzékeny volt spadinra és ruténiumvörösre egyaránt. Ez azt jelenti, hogy az adott csatorna TREK-1 és TREK-2 alegységet egyaránt tartalmazott, tehát az adott csatorna TREK-1/TREK-2 heterodimernek felel meg. A TREK-1/TREK-2 heterodimer létezését natív sejtekben így munkacsoportunk igazolta először. Mivel a két alegység egyéb szövetekben is együttesen fejeződik ki (például a hippocampusban, striatumban, nucl. supraopticusban, a ggl. cervicale superiusban vagy az a. pulmonalis simaizomsejtjeiben), elképzelhető, hogy megközelítésünkkel ezekben a sejtekben is ki lehetne mutatni a TREK-1/TREK-2 heterodimert. Korábban írtak le a nucl. supraopticusban olyan TREK-hez hasonló egyedi csatornákat, amik viszont sem a TREK-1, sem a TREK-2, sem a TRAAK csatornáknak nem voltak megfeleltethetőek, elképzelhető, hogy ezek a „TREK-szerű” csatornák valójában TREK-1/TREK-2 heterodimerek voltak (181). A heterodimernek natív sejtekben az lehet a jelentősége, hogy ha TREK-1 homodimerek helyett TREK-1/TREK-2 heterodimerek keletkeznek a natív sejtekben, a heterodimer nagyobb vezetőképessége miatt nagyobb lesz a háttér káliumáram nagysága. Ez a sejt ingerlékenységének csökkenéséhez vezet, anélkül, hogy közben az áram EC pH-ra vagy spadinra való érzékenysége változna.

A legtöbb eddig jellemzett K_{2P} csatorna heterodimer azonos alcsaládkhoz tartozó alegységekből épül össze. Egy nemrég megjelent közleményben arról számolnak be a szerzők, hogy a TRESK alegységgel a TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimert képeznek heterológ rendszerekben (182). Ez a közlemény nagy érdeklődést váltott ki annak a meglepő eredménynek köszönhetően, hogy a TRESK domináns negatív mutánsai eltérő módon hatnak a TREK csatornákra. Az érző idegsejtek fokozott ingerlékenységét és migrént okozó F139WfsX24 mutáció mind a TREK, mind a TRESK csatornák áramára domináns negatív hatást fejtett ki. Ezzel szemben a migrént nem okozó C110R mutáció csak a TRESK áramra volt domináns negatív hatással, a TREK áramot nem befolyásolta. A TRESK F139WfsX24 mutáció egy kereteltolódással járó deléciós mutáció, ami egy csonka TRESK csatornát hoz létre. Ez a fehérjefragmens felelős a mutáció TRESK áramot gátló hatásáért, viszont nincs hatással a TREK csatornákra. A kereteltolódás eredményeképpen azonban az mRNS-en létrejön egy új translációs iniciációs hely, ami egy másik, csonka csatornafragmenst kódol (ez a fehérje a rövid N-terminális szakaszt követően a TRESK 2. TM szakaszát, nagyméretű IC hurokrégióját, majd 3. és 4. TM szakaszt tartalmazza a 2. pórusdoménnel együtt). A második, csak a TREK csatornákra ható fehérjefragmens adenovirális vektorral történő kifejezése a trigeminális ganglion idegsejtjeiben önmagában elegendő volt a TRESK F139WfsX24 mutáció fenotípusának létrehozásához. Különböző adatbázisokban való keresés során hasonló kereteltolódással járó mutációt azonosítottak a szerzők (Y121LfsX44), amely hasonló hatással volt a TREK és TRESK áramokra, mint a F139WfsX24 mutáció, valamint korrelációt mutat migrénes fenotípussal is.

A TREK-1/TRESK heterodimer működését egyaránt serkentette az arachidonsav és a kalcium ionofór ionomycin, ami azt mutatja, hogy ez a heterodimer csatorna is vegyesen örökli a homodimerek tulajdonságait. A TREK-1/TRESK csatorna egyéb tulajdonságait nem jellemezték a szerzők, mint ahogyan a TREK-2/TRESK heterodimer jellemzése sem történt meg a közleményben. A különböző TREK/TRESK heterodimerek jellemzésére, élettani jelentőségük megállapítására, valamint az érző idegi működés egyéb zavaraiiban játszott esetleges szerepük megállapítására tehát további vizsgálatok szükségesek.

6.2. A cloxyquin a TRESK csatorna szelektív aktivátora

A TRESK csatorna élettani, kórélettani szerepének vizsgálatát nehezíti az, hogy a csatorna aktivitását szelektíven befolyásoló szerek nem ismertek. Egy magas áteresztőképességű vizsgálat során azonban a cloxyquin nevű antimőbás szert azonosítottak, mint a TRESK csatorna hatékony aktivátorát. Doktori munkám részeként meghatároztuk a cloxyquin szelektivitását a K_{2P} alcsaládon belül, valamint tisztáztuk a szer hatásmechanizmusát is.

Xenopus petesejtekben kifejezett egér TRESK csatornák áramát 100 μM cloxyquin 4,4-szeresére aktiválta, viszont nem befolyásolta a többi működőképes egér K_{2P} csatorna áramát, tehát a cloxyquin a TRESK szelektív aktivátora. Meghatároztuk a cloxyquin koncentráció-hatás összefüggését is, a kapott EC_{50} 26,4 μM volt. Az eredeti közleményben a szer által kiváltott maximális aktiváció kisebb volt ennél az értéknél (kb. kétszeres aktivációt kaptak), viszont magasabb affinitásról számoltak be ($EC_{50}=3,2$ μM). A saját és a korábbi közleményben leírt eredmények közötti különbséget magyarázhatja az, hogy más expressziós rendszerben kifejezett csatornákon történtek a mérések. Ugyanis mind az irodalom, mind saját tapasztalataink alapján ismert, hogy a *Xenopus* petesejtekben kapott eredmények eltérhetnek az emlős expressziós rendszerekben kapott adatoktól.

A cloxyquin hatásmechanizmusát különböző farmakológiai eszközökkel, valamint a munkacsoportunk által korábban jellemzett TRESK mutánsok segítségével tisztáztuk. A cloxyquin hatása megmaradt abban az esetben is, ha a citoplazmai kalciumot EGTA injektálásával puffereltük, tehát a szer hatását nem a citoplazmai kalciumszint emelkedése közvetíti.

A calcineurin esetleges szerepe ellen több bizonyíték is szól. A cloxyquin általi aktiváció megtartott volt calcineurin gátlószerral való előkezelés után, valamint akkor is, ha olyan TRESK mutánson végeztük a kísérleteket, amely nem tud calcineurint kötni. Hasonló eredményeket kaptunk a humán TRESK csatorna esetében is. Eredményeink szerint a cloxyquin a TRESK csatorna direkt aktivátora.

A cloxyquin nem fokozta tovább az egér TRESK áramot, ha a csatornákat előzetesen aktiváltuk kalciumjelet létrehozó receptor ingerlésén keresztül.

Hasonló eredményt kaptunk abban az esetben is, ha egy korábban jellemzett konstitutívan aktív egér (vagy humán) TRESK mutánst próbáltunk cloxyquinnel ingerelni. Meglepő módon azonban a humán ortológot a cloxyquin még kismértékben serkenteni tudta a Ca^{2+} /calcineurin jelválya általi aktivációja után is. A szer hatékonysága tehát függ a csatorna aktivációs állapotától, a cloxyquin ugyanis nem tudja tovább aktiválni az előzetesen aktivált TRESK áramot. Hasonló, a TRESK aktiváltsági állapotától függő farmakológiai eszközt már korábban leírt a munkacsoportunk, a benzocaine az aktivált TRESK csatornát nagyobb mértékben gátolja, mint a nyugalomban lévő TRESK csatornát (121).

A cloxyquin hatását vizsgáltuk izolált DRG idegsejteken is. Az idegsejtek egy csoportjában a cloxyquin fokozta a háttér káliumáramot, tehát a cloxyquin alkalmas a TRESK áram azonosítására, illetve serkentésére natív sejtekben is. Közleményünk megjelenése óta más munkacsoport is használta a cloxyquin a TRESK áram azonosítására DRG neuronokban (183).

6.3. Cloxyquin származékok hatása a TRESK csatornára

A cloxyquinról *Xenopus* expressziós rendszerben igazoltuk, hogy a TRESK szelektív aktivátora és segítségével fokozni tudtuk a háttér káliumáram nagyságát izolált idegsejteken. A csatorna aktiválásához *in vivo* körülmények között (akár állatkísérletekben, akár esetleg új gyógyszermolekula esetén) a cloxyquinnél lényegesen potensebb szerekre lenne szükség. A Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetével (Prof. Mátyus Péter és munkatársai) együttműködve új cloxyquin (vagy a cloxyquin szerkezetéhez hasonló) származékokat állítottunk elő abból a célból, hogy nagyobb affinitású TRESK aktivátor vegyülethez jussunk. Vegyületeinket a cloxyquinhez hasonló módon *Xenopus* petesejtekben kifejezett egér TRESK csatornákon teszteltük. Az új vegyületek egy része (10 db) nem befolyásolta a TRESK aktivitását, míg hét vegyület serkentette a TRESK áramot. Ezeknek a vegyületek az affinitása hasonló volt mint a cloxyquiné és a cloxyquinnel ellentétben más $\text{K}_{2\text{P}}$ csatornák áramát is aktiválták. Érdekes módon a maradék 11 analóg gátolta a TRESK áramot. A legígéretesebbnek tűnő két gátlószert (A2764, A2793) részletes vizsgálatnak vetettük alá.

Az új gátlószereink általi TRESK gátlás mindkét vegyület esetében (a bezocainéhoz hasonló) állapotfüggést mutatott. Ha a TRESK csatornát a gátlószer hozzáadása előtt aktiváltuk citoplazmai kalciumjel létrehozásával, nagyobb mértékű gátlást tapasztaltunk, mint a nem aktivált TRESK áram esetén. Az A2764 a K_{2P} alcsaládon belül a TRESK csatornát gátolta a leghatékonyabban. Ezzel szemben az A2793 kevésbé bizonyult szelektívnek a TRESK áramra, mint az A2764, ugyanis a TASK-1 csatornát hasonló mértékben gátolta, mint a TRESK-et. Az A2793 így tehát csak olyan sejtekben alkalmazható a TRESK áram azonosítására, ahol nem fejeződik ki a TASK-1 áram, vagy a TASK-1 áram jelenléte kizárható megfelelő mérési körülmények (pl. alacsony pH) vagy farmakológiai eszközök felhasználásával. Mivel a DRG idegsejtek kifejezik a TASK-1 csatornát is, ezért az izolált DRG idegsejteken végzett kísérleteinkhez az A2764-et használtuk fel. Vad típusú egerekből izolált DRG neuronokon végzett teljes sejt patch clamp kísérletek során az idegsejtek egy csoportjában a háttér káliumáram jelentős hányadát gátolni tudtuk A2764 hozzáadásával. A TRESK génhányos egerekből izolált DRG idegsejtekből teljesen hiányzott ez az A2764-re érzékeny csoport, ami arra utal, hogy az A2764 által gátolt áram valóban a TRESK áramnak felelt meg.

Munkánk kezdetén mRNS-szintű expressziós vizsgálatok és egyedi csatornás mérések alapján ismert volt, hogy a DRG idegsejtek legnagyobb mennyiségben a TRESK és TREK-2 alegységeket fejezik ki (48, 49). Megfelelő farmakológiai eszközök hiányában azonban arra nem volt még adat, hogy egy adott neuron háttér káliumáramához milyen mértékben járulnak hozzá a különböző K_{2P} alegységek. Teljes sejt patch clamp kísérleteink során vad típusú egerek háttér káliumáramát A2764-el és az általunk korábban leírt ruténiumvörös (ruthenium red, RR) együttes alkalmazásával majdnem teljes mértékben (a kontroll érték kb. 15%-ára) gátolni tudtuk. Ez az eredményünk arra utal, hogy a háttér káliumáramért felnőtt egér DRG idegsejtekben elsősorban A2764-érzékeny (TRESK) és RR-érzékeny K_{2P} csatornák felelősek. A RR-érzékeny háttér káliumáramért az mRNS expressziós adatok alapján elsősorban TREK-2, kisebb részben TRAAK csatornák, illetve ezen alegységek egyéb alegységekkel képzett heterodimerjei felelősek.

Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a TRESK fokozott kifejeződése vagy expressziójának csökkentése befolyásolja a primer szenzoros idegsejtek nyugalmi membránpotenciál értékét, valamint ingerlékenységüket is (138, 137, 139). Current clamp felállásban végzett patch clamp kísérletek segítségével megmutattuk, hogy A2764 a DRG neuronokat depolarizálja, illetve a reobázisukat is csökkenti. Ezen paraméterek nem változtak A2764 hatására TRESK génhiányos egerekből izolált idegsejtek esetén, ami arra utal, hogy az A2764 valóban a TRESK gátlásán keresztül fokozza a DRG idegsejtek ingerlékenységét. Előzetes eredményeink szerint az A2764 *Xenopus* petesejtekben gátolja a TRESK/TREK heterodimerek áramát is, így a jövő egyik izgalmas kérdése lesz annak vizsgálata, hogy az A2764 hatásának közvetítésében mekkora szerepe van a TRESK/TREK heterodimereknek.

7. Következtetések

A doktori disszertációmban bemutatott eredmények a K_{2P} csatorna témakörön belül két nagyobb egységre bonthatóak. Az első nagyobb témakör a TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimerizációjának vizsgálata, a második pedig a cloxyquin és származékainak hatása a TRESK csatornára volt. Eredményeinkből az alábbi következtetések vonhatóak le:

- A TREK-1 és TREK-2 alegységek működőképes heterodimert alkotnak heterológ expressziós rendszerekben (*Xenopus* petesejtek, HEK293T sejtvonal)
- A TREK-1/TREK-2 heterodimer farmakológiai érzékenysége alapján elkülöníthető a TREK-1 és TREK-2 homodimerektől.
- A TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimerizációja kimutatható izolált DRG idegsejtekben is.
- Az antiamóbas szerként ismert cloxyquin a TRESK csatorna szelektív aktivátora. A cloxyquin hatását nem a kalcium-calcineurin jelpálya módosításán keresztül fejt ki, tehát a csatorna direkt aktivátora. A cloxyquin csak a nem aktivált TRESK áramra hat, az előzetesen aktivált TRESK áramot a cloxyquin nem serkenti tovább.
- Cloxyquin hatására megnő a háttér káliumáram nagysága izolált DRG idegsejtekben.
- Az A2764 nevű cloxyquinszármazék a TRESK csatorna szelektív gátlószere. Az A2764 hatása szintén állapotfüggő, a gátlás mértéke nagyobb előzetesen aktivált TRESK esetén.
- Izolált DRG idegsejtekben gátolható a háttér káliumáram A2764 felhasználásával. Az A2764 az áram gátlása mellett az idegsejtek depolarizációjához, valamint fokozott ingerlékenységéhez vezetett. TRESK génhiányos egerekből származó DRG idegsejtek esetében az A2764 hatástalan volt. Ez arra utal, hogy az A2764 hatását valóban a TRESK gátlásán keresztül fejt ki.

8. Összefoglalás

A hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion, DRG) idegsejtek kulcsszerepet játszanak a különböző ingerek feldolgozásában. A doktori munkám során vizsgált TREK és TRESK csatornák felelősek ezen idegsejtek háttér káliumáramáért. Kulcsszerepet játszanak a DRG idegsejtek nyugalmi membránpotenciáljának beállításában, valamint ingerlékenységük szabályozásában. A TREK-1 és TREK-2 alegységekről kimutattam, hogy heterológ expressziós rendszerekben (*Xenopus* petesejtek, HEK293T sejtek) működőképes heterodimereket alkotnak. A két alegységet kovalensen összekapcsolva létrehozott mesterséges heterodimer csatorna segítségével meghatároztam a TREK-1/TREK-2 heterodimer tulajdonságait. A TREK-1/TREK-2 vezetőképessége a homodimer csatornák vezetőképessége közé esik, valamint farmakológiai tulajdonságaiban is (alacsony extracelluláris pH, ruténiumvörös és spadin által egyaránt gátolható) eltér a homodimer csatornáktól. A heterodimer csatorna létét sikerült izolált DRG idegsejtekben is igazolnom.

A TRESK csatorna pontos élettani szerepének megismerését nehezíti, hogy a csatornát szelektíven befolyásoló szerek nem ismertek. A cloxyquin nevű antiamóbiás szerről kimutattam, hogy a K_{2P} családon belül csak a TRESK áramát befolyásolja, valamint azt is, hogy a csatornát közvetlenül aktiválja, nem pedig a kalcium-calcineurin útvonal befolyásolásán keresztül. Kimutattam, hogy a cloxyquin serkenti a DRG idegsejtek háttér káliumáramát. Egy új cloxyquin származék, az A2764 pedig a TRESK csatorna szelektív gátlószerének bizonyult. Felhasználásával a TRESK áram szelektíven gátolható DRG idegsejtekben, ami a sejtek depolarizációjához és ingerlékenységük fokozódásához vezet.

9. Summary

The neurons of the dorsal root ganglia play an essential role in the detection and processing of different stimuli. During my doctoral studies, I examined the major determinants of the background K^+ current in DRG neurons, the K_{2P} channels of the TREK and TRESK subfamilies. These channels play a crucial role in determining the resting membrane potential and regulating the excitability of the DRG neurons. We have demonstrated that TREK-1 and TREK-2 subunits form functional heterodimers when coexpressed in heterologous expression systems (*Xenopus* oocytes, HEK293T cells). The properties of the TREK-1/TREK-2 heterodimer were characterised using an artificial heterodimer created by covalently linking the two subunits together. The single channel conductance of the heterodimer is an intermediate value between the conductance of the two parent homodimers. The pharmacological profile of the heterodimer also differs from the parent subunit (the heterodimer is inhibited by low extracellular pH, ruthenium red and spadin). We were able to demonstrate that TREK-1 and TREK-2 form heterodimers in isolated DRG neurons.

Investigation of the physiological role of TRESK has been impeded by a lack of appropriate modulators. We have shown that the antiamoebic drug cloxyquin is a selective activator of TRESK. The stimulatory effect of cloxyquin is a direct effect on the channel and is independent of the calcium-calcineurin pathway. Application of cloxyquin increases the background K^+ current of isolated DRG neurons. We have also shown that a novel cloxyquin derivative, A2764 is a selective inhibitor of TRESK. We were able to block TRESK current with A2764 in isolated DRG neurons, which lead to cell depolarization and increased excitability.

10. Irodalomjegyzék

1. 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⁺ channel involved in polymodal pain perception. *Embo j*, 25: 2368-2376.
2. Mathie A, Veale EL. (2015) Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflugers Arch*, 467: 931-943.
3. 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.
4. Zhou J, Yang CX, Zhong JY, Wang HB. (2013) Intrathecal TRESK gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Neuroreport*, 24: 131-136.
5. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes* (2nd edition). Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 1992.
6. Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T. (2014) Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chem Biol Drug Des*, 83: 1-26.
7. Capener CE, Kim HJ, Arinaminpathy Y, Sansom MS. (2002) Ion channels: structural bioinformatics and modelling. *Hum Mol Genet*, 11: 2425-2433.
8. MacKinnon R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett*, 555: 62-65.
9. Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*, 414: 37-42.
10. Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 414: 43-48.
11. Hodgkin AL, Huxley AF. (1947) Potassium leakage from an active nerve fibre. *J Physiol*, 106: 341-367.
12. Hodgkin AL, Huxley AF. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117: 500-544.

13. Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376: 690-695.
14. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. (1996) A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem*, 271: 4183-4187.
15. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J*, 15: 1004-1011.
16. Enyedi P, Czirjak G. (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, 90: 559-605.
17. Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, Pausch MH. (1996) ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 13256-13261.
18. Kunkel MT, Johnstone DB, Thomas JH, Salkoff L. (2000) Mutants of a temperature-sensitive two-P domain potassium channel. *J Neurosci*, 20: 7517-7524.
19. Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, Muller-Rober B. (1997) New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J*, 16: 2565-2575.
20. Brohawn SG, del Marmol J, MacKinnon R. (2012) Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science*, 335: 436-441.
21. Dong YY, Pike AC, Mackenzie A, McClenaghan C, Aryal P, Dong L, Quigley A, Grieben M, Goubin S, Mukhopadhyay S, Ruda GF, Clausen MV, Cao L, Brennan PE, Burgess-Brown NA, Sansom MS, Tucker SJ, Carpenter EP. (2015) K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science*, 347: 1256-1259.
22. Lolicato M, Arrigoni C, Mori T, Sekioka Y, Bryant C, Clark KA, Minor DL, Jr. (2017) K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature*.

23. Miller AN, Long SB. (2012) Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science*, 335: 432-436.
24. 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⁺ 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.
25. Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E, Lazdunski M. (1996) Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J*, 15: 6400-6407.
26. Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, 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.
27. Schewe M, Nematian-Ardestani E, Sun H, Musinszki M, Cordeiro S, Bucci G, de Groot BL, Tucker SJ, Rapedius M, Baukrowitz T. (2016) A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell*, 164: 937-949.
28. 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⁺ channel. *EMBO J*, 15: 6854-6862.
29. Bang H, Kim Y, Kim D. (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem*, 275: 17412-17419.
30. Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M. (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *Embo j*, 17: 3297-3308.
31. Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 275: 28398-28405.
32. Gu W, Schlichthörl G, Hirsch JR, Engels H, Karschin C, Karschin A, Derst C, Steinlein OK, Daut J. (2002) Expression pattern and functional characteristics of

- two novel splice variants of the two-pore-domain potassium channel TREK-2. *The Journal of Physiology*, 539: 657-668.
33. Ozaita A, Vega-Saenz de Miera E. (2002) Cloning of two transcripts, HKT4.1a and HKT4.1b, from the human two-pore K⁺ channel gene KCNK4. Chromosomal localization, tissue distribution and functional expression. *Brain Res Mol Brain Res*, 102: 18-27.
 34. Xian Tao L, Dyachenko V, Zuzarte M, Putzke C, Preisig-Muller R, Isenberg G, Daut J. (2006) The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovasc Res*, 69: 86-97.
 35. Veale EL, Rees KA, Mathie A, Trapp S. (2010) Dominant negative effects of a non-conducting TREK1 splice variant expressed in brain. *J Biol Chem*, 285: 29295-29304.
 36. Simkin D, Cavanaugh EJ, 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.
 37. Thomas D, Plant LD, Wilkens CM, McCrossan ZA, Goldstein SA. (2008) Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron*, 58: 859-870.
 38. Kim Y, Bang H, Gnatenco C, Kim D. (2001) Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K⁺ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflügers Archiv*, 442: 64-72.
 39. Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *Embo j*, 17: 4283-4290.
 40. Maingret F, Honore E, Lazdunski M, Patel AJ. (2002) Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 292: 339-346.
 41. Aller MI, Wisden W. (2008) Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience*, 151: 1154-1172.
 42. Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kelsell RE, Gloger, II, Pangalos MN. (2001) Distribution analysis of human two pore

- domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res*, 86: 101-114.
43. Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci*, 21: 7491-7505.
 44. Gnatenco C, Han J, Snyder AK, Kim D. (2002) Functional expression of TREK-2 K⁺ channel in cultured rat brain astrocytes. *Brain Res*, 931: 56-67.
 45. Zhou M, Xu G, Xie M, Zhang X, Schools GP, Ma L, Kimelberg HK, Chen H. (2009) TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 29: 8551-8564.
 46. Cadaveira-Mosquera A, Ribeiro SJ, Reboreda A, Perez M, Lamas JA. (2011) Activation of TREK currents by the neuroprotective agent riluzole in mouse sympathetic neurons. *J Neurosci*, 31: 1375-1385.
 47. Kang D, Choe C, Kim D. (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol*, 564: 103-116.
 48. Kang D, Kim D. (2006) TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291: C138-146.
 49. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lonnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggstrom J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, Ernfors P. (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci*, 18: 145-153.
 50. Zhao H, Sprunger LK, Simasko SM. (2010) Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298: G212-221.
 51. Blondeau N, Petrault O, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R, Lazdunski M, Heurteaux C. (2007) Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res*, 101: 176-184.
 52. Enyeart JJ, Liu H, Enyeart JA. (2012) Evidence for cAMP-independent bTREK-1 inhibition by ACTH and NPS-ACTH in adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol*, 348: 305-312.

53. Garry A, Fromy B, Blondeau N, Henrion D, Brau F, Gounon P, Guy N, Heurteaux C, Lazdunski M, Saumet JL. (2007) Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep*, 8: 354-359.
54. Sanders KM, Koh SD. (2006) Two-pore-domain potassium channels in smooth muscles: new components of myogenic regulation. *J Physiol*, 570: 37-43.
55. Tichenor JN, Hansen ET, Buxton IL. (2005) Expression of stretch-activated potassium channels in human myometrium. *Proc West Pharmacol Soc*, 48: 44-48.
56. Zhang H, Shepherd N, Creazzo TL. (2008) Temperature-sensitive TREK currents contribute to setting the resting membrane potential in embryonic atrial myocytes. *J Physiol*, 586: 3645-3656.
57. Brohawn SG, Campbell EB, MacKinnon R. (2014) Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature*, 516: 126-130.
58. Brohawn SG, Su Z, MacKinnon R. (2014) Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 3614-3619.
59. 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.
60. Kim Y, Gnatenco C, Bang H, Kim D. (2001) Localization of TREK-2 K⁺ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 442: 952-960.
61. Maingret F, Patel AJ, 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.
62. Bagriantsev SN, Peyronnet R, Clark KA, Honore E, Minor DL, Jr. (2011) Multiple modalities converge on a common gate to control K₂P channel function. *EMBO J*, 30: 3594-3606.

63. Cohen A, Ben-Abu Y, Hen S, Zilberberg N. (2008) A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J Biol Chem*, 283: 19448-19455.
64. 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.
65. Danthi S, Enyeart JA, Enyeart JJ. (2003) Modulation of native TREK-1 and Kv1.4 K⁺ channels by polyunsaturated fatty acids and lysophospholipids. *J Membr Biol*, 195: 147-164.
66. Maingret F, Patel AJ, 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.
67. Chemin J, Patel A, Duprat F, Zanzouri M, Lazdunski M, Honore E. (2005) Lysophosphatidic acid-operated K⁺ channels. *J Biol Chem*, 280: 4415-4421.
68. Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M, Honore E. (2005) A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *Embo j*, 24: 44-53.
69. Lopes CM, Rohacs T, Czirjak G, Balla T, Enyedi P, Logothetis DE. (2005) PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J Physiol*, 564: 117-129.
70. 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⁺ channels. *Embo j*, 22: 5403-5411.
71. Cain SM, Meadows HJ, Dunlop J, Bushell TJ. (2008) mGlu4 potentiation of K(2P)2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation. *Mol Cell Neurosci*, 37: 32-39.
72. Xiao Z, Deng PY, Rojanathammanee L, Yang C, Grisanti L, Permpoonputtana K, Weinshenker D, Doze VA, Porter JE, Lei S. (2009) Noradrenergic depression of neuronal excitability in the entorhinal cortex via activation of TREK-2 K⁺ channels. *J Biol Chem*, 284: 10980-10991.

73. Murbartian J, Lei Q, Sando JJ, Bayliss DA. (2005) Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem*, 280: 30175-30184.
74. Koh SD, Monaghan K, Sergeant GP, Ro S, Walker RL, Sanders KM, 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.
75. 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.
76. Sandoz G, Tardy MP, Thummler S, Feliciangeli S, Lazdunski M, Lesage F. (2008) Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *J Neurosci*, 28: 8545-8552.
77. Kim E, Hwang EM, Yarishkin O, Yoo JC, Kim D, Park N, Cho M, Lee YS, Sun CH, Yi GS, Yoo J, Kang D, Han J, Hong SG, Park JY. (2010) Enhancement of TREK1 channel surface expression by protein-protein interaction with beta-COP. *Biochem Biophys Res Commun*, 395: 244-250.
78. Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M. (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci*, 2: 422-426.
79. 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⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J*, 23: 2684-2695.
80. Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL, 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.
81. Meadows HJ, Chapman CG, Duckworth DM, Kelsell RE, Murdock PR, Nasir S, Rennie G, Randall AD. (2001) The neuroprotective agent sipatrigine (BW619C89) potently inhibits the human tandem pore-domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Brain Res*, 892: 94-101.

82. Nayak TK, Harinath S, Nama S, Somasundaram K, Sikdar SK. (2009) Inhibition of human two-pore domain K⁺ channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol Pharmacol*, 76: 903-917.
83. Punke MA, Licher T, Pongs O, Friederich P. (2003) Inhibition of Human TREK-1 Channels by Bupivacaine. *Anesthesia & Analgesia*: 1665-1673.
84. Thummler S, Duprat F, Lazdunski M. (2007) Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 354: 284-289.
85. Braun G, Lengyel M, Enyedi P, Czirjak G. (2015) Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *British Journal of Pharmacology*, 172: 1728-1738.
86. Czirjak G, Enyedi P. (2003) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol Pharmacol*, 63: 646-652.
87. 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.
88. Bagriantsev SN, Ang KH, Gallardo-Godoy A, Clark KA, Arkin MR, Renslo AR, Minor DL, Jr. (2013) A high-throughput functional screen identifies small molecule regulators of temperature- and mechano-sensitive K₂P channels. *ACS Chem Biol*, 8: 1841-1851.
89. Beltran L, Beltran M, Aguado A, Gisselmann G, Hatt H. (2013) 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates the mechanically gated human KCNK channels KCNK 2 (TREK-1), KCNK 4 (TRAAK), and KCNK 10 (TREK-2). *Front Pharmacol*, 4: 63.
90. Dadi PK, Vierra NC, Days E, Dickerson MT, Vinson PN, Weaver CD, Jacobson DA. (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.

91. Takahira M, Sakurai M, Sakurada N, Sugiyama K. (2005) Fenamates and diltiazem modulate lipid-sensitive mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Pflugers Arch*, 451: 474-478.
92. Veale EL, Mathie A. (2016) Aristolochic acid, a plant extract used in the treatment of pain and linked to Balkan Endemic Nephropathy, is a regulator of K2P channels. *Br J Pharmacol*.
93. 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 JL, 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.
94. Moha Ou Maati H, Veysiere 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.
95. Veysiere J, Moha Ou Maati H, Mazella J, Gaudriault G, Moreno S, Heurteaux C, Borsotto M. (2015) Retroinverso analogs of spadin display increased antidepressant effects. *Psychopharmacology (Berl)*, 232: 561-574.
96. Sigurdson WJ, Morris CE. (1989) Stretch-activated ion channels in growth cones of snail neurons. *J Neurosci*, 9: 2801-2808.
97. Buckler KJ, Honore E. (2005) The lipid-activated two-pore domain K⁺ channel TREK-1 is resistant to hypoxia: implication for ischaemic neuroprotection. *J Physiol*, 562: 213-222.
98. Heurteaux C, Laigle C, Blondeau N, Jarretou G, Lazdunski M. (2006) Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia. *Neuroscience*, 137: 241-251.
99. 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⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J*, 28: 1308-1318.
100. Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thummler S, Peng XD, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois JM, Debonnel G,

- Lazdunski M. (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci*, 9: 1134-1141.
101. Abraham DM, Lee TE, Watson LJ, Mao L, Chandok G, Wang HG, Frangakis S, Pitt GS, Shah SH, Wolf MJ, Rockman HA. (2018) The two-pore domain potassium channel TREK-1 mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *J Clin Invest*, 128: 4843-4855.
 102. Terrenoire C, Lauritzen I, Lesage F, Romey G, Lazdunski M. (2001) A TREK-1-Like Potassium Channel in Atrial Cells Inhibited by α -Adrenergic Stimulation and Activated by Volatile Anesthetics. *Circulation Research*, 89: 336-342.
 103. Unudurthi SD, Wu X, Qian L, Amari F, Onal B, Li N, Makara MA, Smith SA, Snyder J, Fedorov VV, Coppola V, Anderson ME, Mohler PJ, Hund TJ. (2016) Two-Pore K^+ Channel TREK-1 Regulates Sinoatrial Node Membrane Excitability. *J Am Heart Assoc*, 5: e002865.
 104. Aimond F, Rauzier JM, Bony C, Vassort G. (2000) Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K^+ current ITREK in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 275: 39110-39116.
 105. Klassen MP, Peters CJ, Zhou S, Williams HH, Jan LY, Jan YN. (2017) Age-dependent diastolic heart failure in an in vivo *Drosophila* model. *Elife*, 6.
 106. Decher N, Ortiz-Bonnin B, Friedrich C, Schewe M, Kiper AK, Rinne S, Seemann G, Peyronnet R, Zumhagen S, Bustos D, Kockskamper J, Kohl P, Just S, Gonzalez W, Baukrowitz T, Stallmeyer B, Schulze-Bahr E. (2017) Sodium permeable and "hypersensitive" TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med*, 9: 403-414.
 107. Park KJ, Baker SA, Cho SY, Sanders KM, Koh SD. (2005) Sulfur-containing amino acids block stretch-dependent K^+ channels and nitrergic responses in the murine colon. *Br J Pharmacol*, 144: 1126-1137.
 108. Tertyshnikova S, Knox RJ, Plym MJ, Thalody G, Griffin C, Neelands T, Harden DG, Signor L, Weaver D, Myers RA, Lodge NJ. (2005) BL-1249 [(5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine]: a putative potassium channel opener with bladder-relaxant properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 313: 250-259.

109. Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH. (2004) Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*, 142: 192-202.
110. Enyeart JA, Danthi SJ, Enyeart JJ. (2004) TREK-1 K⁺ channels couple angiotensin II receptors to membrane depolarization and aldosterone secretion in bovine adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287: E1154-1165.
111. Enyeart JA, Liu H, Enyeart JJ. (2008) Curcumin inhibits bTREK-1 K⁺ channels and stimulates cortisol secretion from adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 370: 623-628.
112. Brenner T, O'Shaughnessy KM. (2008) Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295: E1480-1486.
113. Czirjak G, Enyedi P. (2002) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol*, 16: 621-629.
114. 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⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem*, 278: 27406-27412.
115. Czirjak G, Toth ZE, Enyedi P. (2004) The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem*, 279: 18550-18558.
116. Rahm AK, Wiedmann F, Gierten J, Schmidt C, Schweizer PA, Becker R, Katus HA, Thomas D. (2014) Functional characterization of zebrafish K2P18.1 (TRESK) two-pore-domain K⁺ channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 387: 291-300.
117. Kang D, Mariash E, Kim D. (2004) Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem*, 279: 28063-28070.

118. Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R, Wischmeyer E, Doring F. (2007) TRESK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, 585: 867-879.
119. 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.
120. Yoo S, Liu J, Sabbadini M, Au P, Xie GX, Yost CS. (2009) Regional expression of the anesthetic-activated potassium channel TRESK in the rat nervous system. *Neurosci Lett*, 465: 79-84.
121. Czirjak G, Enyedi P. (2006) Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K⁺ channel, TRESK. *J Biol Chem*, 281: 14677-14682.
122. Czirjak G, Enyedi P. (2014) The LQLP calcineurin docking site is a major determinant of the calcium-dependent activation of human TRESK background K⁺ channel. *J Biol Chem*, 289: 29506-29518.
123. Czirjak G, Enyedi P. (2010) TRESK background K(+) channel is inhibited by phosphorylation via two distinct pathways. *J Biol Chem*, 285: 14549-14557.
124. Braun G, Nemesics B, Enyedi P, Czirjak G. (2011) TRESK background K(+) channel is inhibited by PAR-1/MARK microtubule affinity-regulating kinases in *Xenopus oocytes*. *PLoS One*, 6: e28119.
125. Rahm AK, Gierten J, Kisselbach J, Staudacher I, Staudacher K, Schweizer PA, Becker R, Katus HA, Thomas D. (2012) PKC-dependent activation of human K(2P) 18.1 K(+) channels. *Br J Pharmacol*, 166: 764-773.
126. Keshavaprasad B, Liu C, Au JD, Kindler CH, Cotten JF, Yost CS. (2005) Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. *Anesth Analg*, 101: 1042-1049, table of contents.
127. Liu C, Au JD, Zou HL, Cotten JF, Yost CS. (2004) Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg*, 99: 1715-1722, table of contents.

128. Rajan S, Wischmeyer E, Karschin C, Preisig-Muller R, Grzeschik KH, Daut J, Karschin A, Derst C. (2001) THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem*, 276: 7302-7311.
129. Chae YJ, Zhang J, Au P, Sabbadini M, Xie GX, Yost CS. (2010) Discrete change in volatile anesthetic sensitivity in mice with inactivated tandem pore potassium ion channel TRESK. *Anesthesiology*, 113: 1326-1337.
130. Czirjak G, Enyedi P. (2006) Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol Pharmacol*, 69: 1024-1032.
131. Kang D, Kim GT, Kim EJ, La JH, Lee JS, Lee ES, Park JY, Hong SG, Han J. (2008) Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 367: 609-615.
132. Park H, Kim EJ, Ryu JH, Lee DK, Hong SG, Han J, Han J, Kang D. (2018) Verapamil Inhibits TRESK (K2P18.1) Current in Trigeminal Ganglion Neurons Independently of the Blockade of Ca(2+) Influx. *Int J Mol Sci*, 19.
133. Bautista DM, Sigal YM, Milstein AD, Garrison JL, Zorn JA, Tsuruda PR, Nicoll RA, Julius D. (2008) Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat Neurosci*, 11: 772-779.
134. Bruner JK, Zou B, Zhang H, Zhang Y, Schmidt K, Li M. (2014) Identification of novel small molecule modulators of K2P18.1 two-pore potassium channel. *Eur J Pharmacol*, 740: 603-610.
135. Kim S, Lee Y, Tak HM, Park HJ, Sohn YS, Hwang S, Han J, Kang D, Lee KW. (2013) Identification of blocker binding site in mouse TRESK by molecular modeling and mutational studies. *Biochim Biophys Acta*, 1828: 1131-1142.
136. Wright PD, Weir G, Cartland J, Tickle D, Kettleborough C, Cader MZ, Jerman J. (2013) Cloxyquin (5-chloroquinolin-8-ol) is an activator of the two-pore domain potassium channel TRESK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441: 463-468.
137. Yang Y, Li S, Jin ZR, Jing HB, Zhao HY, Liu BH, Liang YJ, Liu LY, Cai J, Wan Y, Xing GG. (2018) Decreased abundance of TRESK two-pore domain potassium channels in sensory neurons underlies the pain associated with bone metastasis. *Sci Signal*, 11.

138. Guo Z, Cao YQ. (2014) Over-expression of TRESK K(+) channels reduces the excitability of trigeminal ganglion nociceptors. *PLoS One*, 9: e87029.
139. Zhou J, Yao SL, Yang CX, Zhong JY, Wang HB, 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.
140. de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM. (2009) Molecular genetics of migraine. *Hum Genet*, 126: 115-132.
141. Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube MP, Marcinkiewicz MM, Ramagopalan S, Ansorge O, Brais B, Sequeiros J, Pereira-Monteiro JM, Griffiths LR, Tucker SJ, Ebers G, Rouleau GA. (2010) A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med*, 16: 1157-1160.
142. Liu P, Xiao Z, Ren F, Guo Z, Chen Z, Zhao H, Cao YQ. (2013) Functional analysis of a migraine-associated TRESK K⁺ channel mutation. *J Neurosci*, 33: 12810-12824.
143. Andres-Enguix I, Shang L, Stansfeld PJ, Morahan JM, Sansom MS, Lafreniere RG, Roy B, Griffiths LR, Rouleau GA, Ebers GC, Cader ZM, Tucker SJ. (2012) Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K channel. *Sci Rep*, 2: 237.
144. Guo Z, Liu P, Ren F, Cao YQ. (2014) Nonmigraine-associated TRESK K⁺ channel variant C110R does not increase the excitability of trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol*, 112: 568-579.
145. Maher BH, Taylor M, Stuart S, Okolicsanyi RK, Roy B, Sutherland HG, Haupt LM, Griffiths LR. (2013) Analysis of 3 common polymorphisms in the KCNK18 gene in an Australian Migraine case-control cohort. *Gene*, 528: 343-346.
146. Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, Alakurtti K, Anttila V, Farkkila M, Hamalainen E, Kaprio J, Kaunisto MA, Heath AC, Montgomery GW, Gobel H, Todt U, Ferrari MD, Launer LJ, Frants RR, Terwindt GM, de Vries B, Verschuren WM, Brand J, Freilinger T, Pfaffenrath V, Straube A, Ballinger DG, Zhan Y, Daly MJ, Cox DR, Dichgans M, van den Maagdenberg AM, Kubisch

- C, Martin NG, Wessman M, Peltonen L, Palotie A. (2008) A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet*, 17: 3318-3331.
147. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, Kurth T, Bettella F, McMahon G, Kallela M, Malik R, de Vries B, Terwindt G, Medland SE, Todt U, McArdle WL, Quaye L, Koironen M, Ikram MA, Lehtimäki T, Stam AH, Ligthart L, Wedenoja J, Dunham I, Neale BM, Palta P, Hamalainen E, Schurks M, Rose LM, Buring JE, Ridker PM, Steinberg S, Stefansson H, Jakobsson F, Lawlor DA, Evans DM, Ring SM, Farkkila M, Artto V, Kaunisto MA, Freilinger T, Schoenen J, Frants RR, Pelzer N, Weller CM, Zielman R, Heath AC, Madden PA, Montgomery GW, Martin NG, Borck G, Gobel H, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Williams FM, Hartikainen AL, Pouta A, van den Ende J, Uitterlinden AG, Hofman A, Amin N, Hottenga JJ, Vink JM, Heikkila K, Alexander M, Muller-Myhsok B, Schreiber S, Meitinger T, Wichmann HE, Aromaa A, Eriksson JG, Traynor BJ, Trabzuni D, Rossin E, Lage K, Jacobs SB, Gibbs JR, Birney E, Kaprio J, Penninx BW, Boomsma DI, van Duijn C, Raitakari O, Jarvelin MR, Zwart JA, Cherkas L, Strachan DP, Kubisch C, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Dichgans M, Wessman M, Smith GD, Stefansson K, Daly MJ, Nyholt DR, Chasman DI, Palotie A, North American Brain Expression C, Consortium UKBE, International Headache Genetics C. (2013) Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet*, 45: 912-917.
148. Cadaveira-Mosquera A, Perez M, Reboreda A, Rivas-Ramirez P, Fernandez-Fernandez D, Lamas JA. (2012) Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system. *J Mol Neurosci*, 48: 86-96.
149. Grabauskas G, Wu X, Song I, Zhou SY, Lanigan T, Owyang C. (2016) Increased Activation of the TRESK K(+) Mediates Vago-Vagal Reflex Malfunction in Diabetic Rats. *Gastroenterology*, 151: 910-922 e917.
150. Cheng W, Sun C, Zheng J. (2010) Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell*, 1: 802-810.

151. Herguedas B, Krieger J, Greger IH. (2013) Receptor heteromeric assembly-how it works and why it matters: the case of ionotropic glutamate receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 117: 361-386.
152. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868: 233-285.
153. Czirjak G, Toth ZE, 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.
154. Smith KE, Wilkie SE, Tebbs-Warner JT, Jarvis BJ, Gallasch L, Stocker M, Hunt DM. (2012) Functional analysis of missense mutations in Kv8.2 causing cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram. *J Biol Chem*, 287: 43972-43983.
155. Wissinger B, Schaich S, Baumann B, Bonin M, Jagle H, Friedburg C, Varsanyi B, Hoyng CB, Dollfus H, Heckenlively JR, Rosenberg T, Rudolph G, Kellner U, Salati R, Plomp A, De Baere E, Andrassi-Darida M, Sauer A, Wolf C, Zobor D, Bernd A, Leroy BP, Enyedi P, Cremers FP, Lorenz B, Zrenner E, Kohl S. (2011) Large deletions of the KCNV2 gene are common in patients with cone dystrophy with supernormal rod response. *Hum Mutat*, 32: 1398-1406.
156. Czirjak 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.
157. Berg AP, Talley EM, Manger JP, Bayliss DA. (2004) Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci*, 24: 6693-6702.
158. Kang D, Han J, Talley EM, Bayliss DA, Kim D. (2004) Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J Physiol*, 554: 64-77.
159. Kim D, Cavanaugh EJ, Kim I, Carroll JL. (2009) Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol*, 587: 2963-2975.

160. Musset B, Meuth SG, Liu GX, Derst C, Wegner S, Pape HC, Budde T, Preisig-Muller R, Daut J. (2006) Effects of divalent cations and spermine on the K⁺ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J Physiol*, 572: 639-657.
161. Larkman PM, Perkins EM. (2005) A TASK-like pH- and amine-sensitive 'leak' K⁺ conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro. *Eur J Neurosci*, 21: 679-691.
162. Meuth SG, Aller MI, Munsch T, Schuhmacher T, Seidenbecher T, Meuth P, Kleinschnitz C, Pape HC, Wiendl H, Wisden W, Budde T. (2006) The contribution of TWIK-related acid-sensitive K⁺-containing channels to the function of dorsal lateral geniculate thalamocortical relay neurons. *Mol Pharmacol*, 69: 1468-1476.
163. Torborg CL, Berg AP, Jeffries BW, Bayliss DA, McBain CJ. (2006) TASK-like conductances are present within hippocampal CA1 stratum oriens interneuron subpopulations. *J Neurosci*, 26: 7362-7367.
164. Rinne S, Kiper AK, Schlichthorl G, Dittmann S, Netter MF, Limberg SH, Silbernagel N, Zuzarte M, Moosdorf R, Wulf H, Schulze-Bahr E, Rolfes C, Decher N. (2015) TASK-1 and TASK-3 may form heterodimers in human atrial cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 81: 71-80.
165. Plant LD, Zuniga L, Araki D, Marks JD, Goldstein SA. (2012) SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal*, 5: ra84.
166. Rajan S, Plant LD, Rabin ML, Butler MH, Goldstein SA. (2005) Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. *Cell*, 121: 37-47.
167. Plant LD, Dementieva IS, Kollwe A, Olikara S, Marks JD, Goldstein SA. (2010) One SUMO is sufficient to silence the dimeric potassium channel K2P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 10743-10748.
168. Decressac S, Franco M, Bendahhou S, Warth R, Knauer S, Barhanin J, Lazdunski M, Lesage F. (2004) ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K⁺ channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6. *EMBO Rep*, 5: 1171-1175.

169. Feliciangeli S, Tardy MP, Sandoz G, Chatelain FC, Warth R, Barhanin J, Bendahhou S, Lesage F. (2010) Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *J Biol Chem*, 285: 4798-4805.
170. Hwang EM, Kim E, Yarishkin O, Woo DH, Han KS, Park N, Bae Y, Woo J, Kim D, Park M, Lee CJ, Park JY. (2014) A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat Commun*, 5: 3227.
171. Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. (2007) Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature*, 449: 607-610.
172. Blin S, Ben Soussia I, Kim EJ, 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.
173. Du Y, Kiyoshi CM, Wang Q, Wang W, Ma B, Alford CC, Zhong S, Wan Q, Chen H, Lloyd EE, Bryan RM, Zhou M. (2016) Genetic Deletion of TREK-1 or TWIK-1/TREK-1 Potassium Channels does not Alter the Basic Electrophysiological Properties of Mature Hippocampal Astrocytes In Situ. *Front Cell Neurosci*, 10: 13.
174. Chatelain FC, Bichet D, Feliciangeli S, Larroque MM, Braud VM, Douguet D, Lesage F. (2013) Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 288: 35081-35092.
175. Renigunta V, Zou X, Kling S, Schlichthorl G, Daut J. (2014) Breaking the silence: functional expression of the two-pore-domain potassium channel THIK-2. *Pflugers Arch*, 466: 1735-1745.
176. Blin S, Chatelain FC, Feliciangeli S, Kang D, Lesage F, Bichet D. (2014) Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem*, 289: 28202-28212.
177. Theilig F, Goranova I, Hirsch JR, Wieske M, Unsal S, Bachmann S, Veh RW, Derst C. (2008) Cellular localization of THIK-1 (K(2P)13.1) and THIK-2 (K(2P)12.1) K channels in the mammalian kidney. *Cell Physiol Biochem*, 21: 63-74.

178. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. (2004) Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol*, 22: 589-594.
179. Toth JT, Gulyas G, Toth DJ, Balla A, Hammond GR, Hunyady L, Balla T, Varnai P. (2016) BRET-monitoring of the dynamic changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochim Biophys Acta*, 1861: 177-187.
180. Levitz J, Royal P, Comoglio Y, Wdziekonski B, Schaub S, Clemens DM, Isacoff EY, 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.
181. Han J, Gnatenco C, Sladek CD, Kim D. (2003) Background and tandem-pore potassium channels in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *The Journal of Physiology*, 546: 625-639.
182. 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.
183. Castellanos A, Andres A, Bernal L, Callejo G, Comes N, Gual A, Giblin JP, Roza C, Gasull X. (2017) Pyrethroids inhibit K2P channels and activate sensory neurons: basis of insecticide-induced paraesthesias. *PAIN*, Articles in Press.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Lengyel M, Czirják G, Enyedi P

Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits.

J Biol Chem 291(26):13649-13661.(2016) **IF: 4,125**

Lengyel M, Dobolyi A, Czirják G, Enyedi P

Selective and state-dependent activation of TRESK (K_{2P} 18.1) background potassium channel by cloxyquin.

Br. J. Pharmacology 174(13):2102-2113. (2017) **IF: 6,810**

Lengyel M, Erdélyi F, Pergel E, Bálint-Polonka Á, Dobolyi A, Bozsaki P, Dux M, Király K, Hegedűs T, Czirják G, Mátyus P, Enyedi P

Chemically Modified Derivatives of the Activator Compound Cloxyquin Exert Inhibitory Effect on TRESK (K_{2P}18.1) Background Potassium Channel.

Mol Pharmacol., mol.118.115626 (2019) **IF: 3,978**

Egyéb közlemények

Braun G, **Lengyel M**, Enyedi P, Czirják G

Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red.

Br. J. Pharmacology 172(7):1728-1738. (2015) **IF: 5,259**

Lengyel M, Czirják G, Enyedi P

TRESK background potassium channel is not gated at the helix bundle crossing near the cytoplasmic end of the pore.

PLoS One, 13: e0197622 (2018) **IF: 2,766**

Papp R, Nagaraj C, Zabini D, Nagy BM, **Lengyel M**, Maurer DS, Sharma N, Egemnazarov B, Kovács G, Kwapiszewska G, Marsh LM, Hrzenjak A, Höfler G, Didiasova M, Wygrecka M, Schenk L, Szűcs P, Enyedi P, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski H, Olschewski A

Targeting TMEM16A to reverse vasoconstriction and remodeling in idiopathic PAH.
Eur. Resp. J., DOI:10.1183/13993003.00965-2018 (2019) **IF: 12,242**

Pergel E, **Lengyel M**, Enyedi P, Czirják G

TRESK (K2P18.1) Background Potassium Channel is Activated by Novel-Type Protein Kinase C via Dephosphorylation.

Mol Pharmacol., mol.119.116269 (2019) **IF: 3,978**

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Enyedi Péter professzor úrnak tartozom köszönettel azért, hogy még diákkörös hallgatóként bevezetett a tudományos kutatás világába és lehetőséget biztosított arra, hogy doktoranduszként folytathassam munkámat. Hálas vagyok iránymutatásáért, tanácsaiért és türelméért, aminek határát –számomra meglepő módon- soha sem sikerült átlépnem. Köszönettel tartozom Hunyady László professzor úrnak, hogy intézetvezetőként lehetővé tette és támogatta tudományos munkámat. Köszönettel tartozom dr. Ligeti Erzsébet professzor asszonynak, hogy kezdetben program, majd doktori iskola vezetőként végig támogatta szakmai tevékenységemet. Köszönettel tartozom laborunk munkatársainak dr. Czirják Gábornak, dr. Braun Gabriellának és Pergel Enikőnek, akik értékes ötleteikkel nagyban hozzájárultak doktori munkám sikerességéhez. Kiemelt köszönettel tartozom asszisztenseinknek, Dobolyi Alicenak és Veres Irénnek, akiknek az áldozatos munkája nélkül az itt bemutatott eredmények nem születhettek volna meg. Köszönöm TDK hallgatóimnak Bilodid Sofiának és Bozsaki Péternek munkájukat, valamint azt, hogy érdeklődésükkel és kérdéseikkel motiválni tudtak akkor is, ha a közös munkánk nehézségekbe ütközött. Köszönettel tartozom dr. Tóth Baláznak és dr. Petheő Gábornak a patch clamp technika elsajátításában, valamint az évek során felmerülő ügyes-bajos kérdésekben nyújtott segítségüket. Köszönöm az Élettani Intézet valamennyi munkatársának azt az inspiráló környezetet, ahová minden túlzás nélkül örömmel jártam be dolgozni az elmúlt években. Külön szeretnék köszönetet mondani Prof. Várnai Péternek, hogy annak idején figyelmembe ajánlotta az Enyedi labort, mint TDK lehetőséget és hogy segítségére azóta is mindig számíthattam. Köszönettel tartozom Prof. Andrea Olschewski-nek, hogy több alkalommal is eltölthettem rövidebb-hosszabb időt grazi laboratóriumában és a közösen elvégzett kollaborációs munkáért. Köszönettel tartozom Prof. Mátyus Péternek és Dr. Bálint-Polonkai Ágnesnek a cloxyquinszármazékok előállításáért, Dr. Erdélyi Ferencnek pedig a TRESK KO egér létrehozásáért. A Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájának, az Emberi Erőforrások Minisztériumának, valamint a Magyar Élettani Társaságnak, hogy az utóbbi években különböző utazási támogatásokkal és ösztöndíjakkal támogatták munkámat. Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönettel tartozom családomnak, mennyasszonyomnak, barátaimnak azért a rengeteg szeretetért és támogatásért amit tőlük kaptam, nélkülük ez a munka nem jött volna létre.