

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

Doktori tézisek

Dr. Lengyel Miklós

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Enyedi Péter, DSc., 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

Bevezetés

Hodgkin és Huxley 1950-es években végzett kísérletei óta ismert, hogy a plazmamembrán nyugalmi káliumkonduktanciája magas. A két pórusdoménnel rendelkező K_{2P} csatornákat, melyek e nagy konduktanciáért felelősek molekulák, azonban csak jóval később, a többi káliumcsatorna család megismerését követően sikerült azonosítani. A K_{2P} csatornák nevüket arról kapták, hogy alegységként 2 pórusdomént tartalmaznak, így a többi káliumcsatorna alegységgel szemben nem tetramerként, hanem dimerként működőképesek. Minden membránpotenciál érték mellett nyitva vannak, emiatt kulcsszerepet játszanak a nyugalmi membránpotenciál meghatározásában. Működésüket számos intra- és extracelluláris tényező befolyásolhatja. Aktivitásuk fokozódása a sejtek hiperpolarizációjához, így ingerlékenységük csökkenéséhez vezet.

A környezeti ingerek feldolgozásában kulcsszerepet játszanak a hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion, DRG) és trigeminális ganglion (TG) primer szomatoszenzoros idegsejtjei.

Doktori munkám során a DRG és TG idegsejtekben nagy mennyiségben kifejeződő, a fájdalomérzékelésben és migrénben több közlemény szerint is szerepet játszó TREK (TWIK-Related K^+ channel) és TRESK (TWIK-Related Spinal cord K^+ channel) K_{2P} csatornákat vizsgáltam.

A káliumcsatornák többi családjában egymástól eltérő alegységek összeépülése gyakori jelenség, ami lehetővé teszi az áram tulajdonságainak az adott sejtben betöltött funkcióra való optimalizálását, „finomra hangolását”. A K_{2P} család esetében azonban eddig kevés példát találtak a heterodimerizációra, az első működőképes heterodimert (TASK-1/TASK-3 heterodimer) munkacsoportunk írta le. A TREK-1 és TREK-2 alegységek kifejeződési mintázata átfed a szervezetben, viszont több fontos tulajdonságukban (egyedi csatorna és farmkológiai tulajdonságok) eltérnek egymástól.

Munkám egyik céljával tehát a TREK-1 és TREK-2 alegységek heterodimerizációjának vizsgálatát, heterodimerjük jellemzését, illetve natív sejtekben való kimutatását tűztem.

A K_{2P} csatornák élettani-kórélettani szerepének vizsgálatát nehezíti a megfelelő szelektivitású modulátorok hiánya. Nagy áteresztőképességű vizsgálatok során a cloxyquint (egy antiaritmia célra is alkalmazott szert) azonosították, mint TRESK csatornát aktiváló vegyületet, azonban a szelektivitását és hatásmechanizmusát nem vizsgálták részletesen. Doktori munkám másik fő céljaként ennek a vegyületnek a vizsgálatát tűztem ki. Abban az esetben, ha a cloxyquin közvetlen aktivátora a TRESK csatornának és más K_{2P} csatornákra nem hat, először lenne a kezünkben olyan eszköz, amivel a TRESK áramot szelektíven aktiválni lehet. Ez lehetőséget biztosítana arra, hogy natív sejtekben teljes sejt mérésével azonosítani lehessen a TRESK áramot. Emellett elképzelhető, hogy a cloxyquin kémiai módosításával újabb TRESK modulátorokat hozzunk létre, amelyek mind kísérleti eszközként, megfelelően potens aktiválószerként pedig akár potenciális gyógyszermolekulaként értékesek lehetnek.

Célkitűzések

1. 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. Célunk a 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 antiamóbas szerként használt cloxyquin vegyületet. Célunk a cloxyquin szelektivitása és hatásmechanizmusának tisztázása *Xenopus* petesejtekben kifejezett csatornákon.
3. Amennyiben a cloxyquin megfelelően szelektív, kémiai módosításával új TRESK modulátorok előállítására és vizsgálata *Xenopus* petesejtekben.
4. Az általunk létrehozott TRESK modulátorok hatásainak vizsgálata izolált hátsó gyöki ganglion idegsejteken.

Módszerek

Petesejtek preparálása, injektálása

Afrikai karmosbékákból (*Xenopus laevis*) petesejteket izoláltunk, majd a sejteket a vizsgálni kívánt csatornát kódoló cRNS-el injektáltuk. A méréseket 2-3 nappal az injektálás után végeztük.

Felnőtt egér DRG idegsejt kultúra előállítása

Három hónapos FVB/Ant egereket (vad típusú vagy TRESK KO) CO₂ belélegeztetésével túlaltattunk. A gerincvelői dúcokat 37 °C-on kollagenázzal emésztettük, majd mechanikus disszociációt követően a sejtszuspenziót lecentrifugáltuk és poli-L-lizinnel kezelt sejttenyésztő edényekbe osztottuk. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ légterű termosztátban tartottuk. A sejtek letapadása után, a preparálástól számított 48 órán belül végeztünk méréseket a sejteken.

HEK293T sejttenyésztet, tranziens transzfekció

A HEK293T sejtvonalat antibiotikumokat és 10% FBS-t tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük. A patch clamp kísérleteket a különböző csatornákkal való transzfektálás (Lipofectamin 2000) után 24-48 óra múlva végeztük.

Két-elektrodos voltage clamp mérések

A *Xenopus* petesejtek membránján átfolyó áramot két-elektrodos voltage clamp módszerrel mértük, OC725C erősítő segítségével. Az extracelluláris (EC) oldat 2 vagy 80 mM $[K^+]$ -t tartalmazott, az oldatok $[K^+]$ és $[Na^+]$ összege állandó volt. A méréshez használt mikroelektrodokat 3 M KCl-dal töltöttük meg, ekkor ellenállásuk 0,3-1 M Ω volt. Mérési adatainkat pClamp 10.3 szoftver segítségével regisztráltuk és értékeltük ki. A háttér K^+ -áramot a magas $[K^+]$ oldatban, szobahőmérsékleten (21 °C) mértük egy ismétlődő, 300 ms hosszú -100 mV-os feszültséglépés végén befelé irányuló áramként mértük, a kapott értékből levontuk az alacsony $[K^+]$ oldatban mért értéket.

Teljes sejt patch clamp mérések

Teljes sejt patch clamp méréseket HEK293T sejteken és DRG neuronokon végeztünk. A patch pipetta egy Axopatch-1D patch-clamp erősítőhöz csatlakozott. Az EC oldat 2 vagy 30 mM $[K^+]$ -t tartalmazott, a $[K^+]$ és $[Na^+]$ összege állandó volt. A háttér K^+ -áramot hasonlóan határoztuk meg és regisztráltuk mint a két-elektrodos voltage clamp mérések esetében.

Kitépelt foltos patch clamp mérések

A kitépelt foltos mérésekhez ugyanazt a patch clamp rendszert használtuk, mint a teljes-sejt mérésekhez. Az adatokat 2 kHz-en szűrtük, a mintavételezés pedig 20 kHz-en történt. Inside-out felállásban történő méréseket *Xenopus* petesejtekből kitépelt membránfoltokon, +60 mV-os membránpotenciál mellett végeztük. Outside-out felállásban is végeztünk kísérleteket *Xenopus* petesejtekből és DRG neuronokból származó membránfoltokon, -60 mV-os membránpotenciál mellett. Méréseinkből kiszámoltuk a csatornák vezetőképességét, nyitvatartási valószínűségét (P_o), valamint A csatornaszám (N) ismeretében a csatornaaktivitást is (NP_o).

Plazmidok és cRNS

A különböző csatornákat kódoló cDNS-eket a pXEN *Xenopus* petesejt expressziós vektorba klónoztuk, majd *in vitro* cRNS-t állítottuk elő az mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription kit segítségével. Az RNS épségét denaturáló agarózgélen ellenőriztük, mennyiségét fotométerrel kvantifikáltuk. Minden konstrukció helyes bázissorrendjét szekvenálással ellenőriztettük.

A mutáns konstrukciókat a QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit felhasználásával hoztuk létre. Emlős sejtekben való kifejezéshez a csatornákat pcDNA3.1 vagy PIRE5-CD8 vektorba klónoztuk át.

Membránfrakció preparálás, Western blot

Különböző csatornákat kifejező *Xenopus* petesejteket fejztünk ki, majd 2 nappal az injektálást követően membránfrakciót izoláltunk. A kapott membránfrakciót 1% Tritont tartalmazó oldatban forgatással szolubilizáltuk, majd anti-V5 antitesttel konjugált gyöngyökkel egy éjszakán át kevertük. A gyantához kötött fehérjéket SDS-tartalmú mintapufferbe eluáltuk. Az eluált fehérjéket SDS-PAGE-el választottuk szét, majd Western Blot technikával tettük láthatóvá. Ehhez egér monoklonális FLAG-ellenes antitestet valamint tormaperoxidáz enzimmal konjugált, kecske eredetű anti-egér IgG antitestet használtunk.

Statisztikai elemzés

A kísérleti adatok összehasonlítását Origin8 vagy a Statistica program felhasználásával végeztem. Az esetek többségében Student-féle t-próbát vagy egyutas ANOVA-t (Tukey-féle post hoc teszttel) használtam.

Ahol az adatokat nem lehetett parametrikus statisztikai próbával összehasonlítani, a megfelelő nem-parametrikus statisztikai próbát végeztem el. A kísérletekhez tartozó elemszámot megadtam a szövegben, valamint az ábraalírásokban is. Statisztikai elemzésünk során a 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük statisztikailag jelentősnek.

Eredmények

A TREK-1 és TREK-2 alegységek együttes kifejeződése több szövetben ismert, így elképzelhető, hogy működőképes heterodimert alkotnak. A heterodimer vizsgálatát azzal kezdtem, hogy létrehoztam olyan konstrukciót, ahol a TREK-1 és TREK-2 alegységeket egymáshoz kapcsoltn fejeződnek ki. Ez a mesterséges heterodimer EC pH- és RR-érzékenysége alapján elkülöníthető a TREK-1 és TREK-2 homodimerektől. Ha TREK-1 és TREK-2 csatornákat egymás mellett fejezünk ki *Xenopus* petesejtekben vagy HEK293T sejtekben, a kapott áram pH- és RR-érzékenysége arra utal, hogy a homodimerek mellett TREK-1/TREK-2 heterodimer csatorna is keletkezik. A heterodimer létrejöttét biokémiai módszerekkel is sikerült igazolni.

A TREK-1 és TREK-2 esetén egyaránt több eltérő vezetőképességű izoforma ismert, ennek oka az alternatív transzláció iniciáció következtében eltérő hosszúságú N-terminális. Létrehoztam olyan mutáns TREK-1 és TREK csatornákat, ahol csak egy vezetőképességű forma keletkezik.

Ezekből a mutánsokból tandem csatornát is készítettem. Ezt követően *Xenopus* petesejtekből membránfoltokat téptem ki és meghatároztam a csatornák vezetőképességét. A mutáns tandem vezetőképessége a TREK-1 és TREK-2 homodimereké közé esik, így elkülöníthető tőlük vezetőképesség alapján. A két alegység együttes kifejezése esetén keletkeznek a tandem csatornának megfelelő vezetőképességű csatornák. A heterodimer keletkezését így tehát az egyedi csatornák szintjén is sikerült igazolni.

A beállított egyedi csatornás patch clamp módszer felhasználásával meghatároztam az egyedi TREK csatornák gátlószeres érzékenységét is (RR, EC pH, spadin). A TREK-1/TREK-2 tandem egyaránt érzékeny volt spadinra (a TREK-1 szelektív gátlószere) és RR-re, így elkülöníthető a TREK-1 és TREK-2 homodimerektől. DRG idegsejtekből kitépelt membránfoltokban találtunk olyan K^+ -csatornákat, amelyek RR-re és spadinra egyaránt érzékenyek voltak. A TREK-1/TREK-2 heterodimer keletkezését így natív szövetben is igazoltuk.

Egy nagy átteresztőképességű szűrővizsgálat során azonosították a cloxyquint, mint TRESK aktivátort. A szer szelektivitását és hatásmechanizmusát azonban nem tisztázták. Ezeket a kérdéseket a munkacsoportunk által korábban megklónozott egér K_{2P} csatornák és megváltozott szabályozású TRESK mutánsok felhasználásával vizsgáltam. A cloxyquin a TRESK kivételével nem befolyásolta a *Xenopus* petesejtekben kifejezett egér K_{2P} csatornák áramát. Egér TRESK csatorna esetében kb. 4,5-szeres aktivációt volt megfigyelhető, az EC_{50} érték pedig $26,4 \mu\text{M}$ volt. A cloxyquin hatása függ a csatorna aktivációs állapotától, az előzetesen kalciumjellel aktivált, vagy konstitutívan aktív csatorna áramát ugyanis nem serkentette tovább a cloxyquin. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a cloxyquin a csatorna aktivitását a kalcium-calcineurin útvonal serkentésén fokozza. A cloxyquin-általi aktiváció mértékét azonban sem a petesejtek kalcium kelátor EGTA-val való injektálása, sem a calcineurin gátlószer FK506-al történő előkezelés nem befolyásolta. A cloxyquin aktiválta azt a TRESK csatornát is melynek calcineurin kötését mutációval megszüntettük.

A cloxyquin nem a fiziológás foszforilációs/defoszforilációs útvonalon keresztül aktiválja a TRESK-et, hanem minden valószínűség szerint közvetlenül hat a csatornára. Izolált DRG idegsejtekben a cloxyquin serkentette a háttér káliumáramot, felhasználásával tehát a TRESK natív sejtekben is kimutatható.

Ahhoz, hogy a TRESK csatornát *in vivo* körülmények között aktiváljuk (akár állatkísérletekben, akár egy új gyógyszermolekula esetén) a cloxyquinnél potensebb vegyületre lenne szükség. Ezért a Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetével (Prof. Mátyus Péter és munkatársai) együttműködve új cloxyquin (vagy a cloxyquin szerkezetéhez hasonló) származékokat állítottunk elő. Ezeket a vegyületeket a cloxyquinhez hasonló módon, *Xenopus* petesejtekben kifejezett egér K_{2P} csatornákon teszteltük. A cloxyquinnél előnyösebb tulajdonságú aktiválószer sajnos nem sikerült találni, viszont több TRESK analóg gátlószernek bizonyult.. Közülük két vegyületet (A2764, A2793) részletesebb elemzésnek vetettük alá.

Mindkét vegyület hatása állapotfüggést mutatott, a kalciumjellel előzetesen aktivált csatornák áramát nagyobb mértékben gátolták, mint a nem aktivált csatornák áramát. A gátlás állapotfüggése kifejezettebb volt az A2793 esetében, viszont ez a vegyület a TASK-1 csatornát hasonló hatékonysággal gátolta, mint a TRESK-et. Az A2764 azonban a K_{2P} csatornák közül a TRESK-et gátolta leghatékonyabban, ezért ezt a vegyületet használtam a DRG idegsejteken végzett patch clamp kísérletekhez. Vad típusú egerekből izolált DRG idegsejtek egy részében a háttér káliumáram jelentős része gátolható volt A2764 felhasználásával. Az A2764 nem hatott a TRESK KO egerekből izolált DRG idegsejtek háttér kálium áramára, tehát az A2764 valóban a TRESK áramot gátolta a vad típusú idegsejtekben. Current clamp üzemmódban végzett patch clamp kísérletek során pedig az A2764 depolarizálta a vad típusú DRG idegsejteket, valamint csökkentette reobázisukat. Ezen paraméterek TRESK KO egerekből izolált DRG idegsejtek esetében nem változtak A2764 hatására.

Ez arra utal, hogy a vad típusú egereknél megfigyelt változások valóban a TRESK gátlás következményei.

Következtetések

-A TREK-1 és TREK-2 alegységek működőképes heterodimert alkotnak heterológ expressziós rendszerekben. A TREK-1/TREK-2 heterodimer farmakológiai tulajdonságai alapján elkülöníthető a TREK-1 és TREK-2 homodimerektől.

-A TREK-1 és TREK-2 heterodimerizációja kimutatható izolált DRG idegsejtekben is.

-A cloxyquin a TRESK szelektív aktivátora. Hatását a csatornára közvetlenül fejt ki, az aktivációban a kalcium-calcineurin jelpálya nem játszik szerepet. A cloxyquin hatása állapotfüggő, az előzetesen aktivált TRESK áramot a cloxyquin nem serkenti tovább.

-Cloxyquin hatására megnő a DRG idegsejtek háttér káliumárama

-Az A2764 nevű cloxyquinszármazék a TRESK szelektív gátlószere.

Hatása szintén állapotfüggő, az előzetesen aktivált TRESK áramot nagyobb mértékben gátolja.

-Izolált DRG idegsejtek háttér kálium áramát az A2764 gátolja. Ennek eredményeképpen a sejtek depolarizációja, valamint reobázisuk csökkenése is megfigyelhető. TRESK KO egerek DRG idegsejtjei esetében az A2764 hatástalan volt, tehát az A2764 hatását valóban a TRESK gátlásán keresztül fejt ki.

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, Hrzjenjak 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**