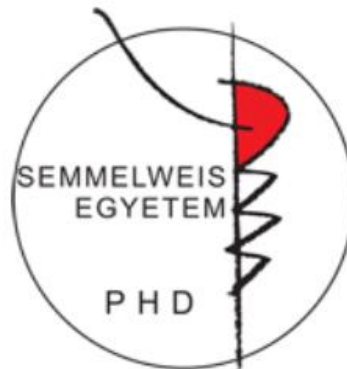


A TRESK háttér K⁺ csatorna protein kináz C általi szabályozásának vizsgálata

Doktori értekezés

Pergel Enikő

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Czirják Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Elnök: Dr. Igaz Péter, D.Sc., egyetemi tanár
Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens
Tagok: Dr. Herényi Levente, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Vellainé Takács Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Smeller László, D.Sc., egyetemi tanár
Tagok: Dr. Tóth Balázs, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Hádinger Nóra, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest

2019

1. Tartalomjegyzék

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. BEVEZETÉS	6
3.1 A két pórusdoménnal rendelkező (K ₂ P) háttér kálium csatornák általános jellemzése és élettani jelentőségük rövid áttekintése	6
3.1.1 Szerkezeti sajátosságok	6
3.1.2 Elektrofiziológiai tulajdonságok	9
3.1.3 Szabályozási mechanizmusok	12
3.1.4 Általános élettani és orvosi jelentőség	15
3.1.5 A K ₂ P csatornák szerepe a fájdalomérzésben	17
3.2 A TRESK (K ₂ P18) csatorna korábban megismert tulajdonságai.....	19
3.2.1 A TRESK helye a K ₂ P háttér K ⁺ csatorna családban	19
3.2.2 Receptor mediált szabályozás.....	23
3.2.3 Kalcineurin foszfatáz – a TRESK szabályozás központi kulcs enzime ...	25
3.2.4 Kevésbé vizsgált szabályozási útvonalak.....	27
3.2.5 Élettani jelentőség.....	29
3.2.6 Farmakológiai tulajdonságok.....	33
3.3 A TRESK és protein kináz C kapcsolatának előzményei	35
3.3.1 A protein kináz C enzimek csoportosítása és az ”új típusú” (novel) izoformák helye az enzimesaládon belül	35
3.3.2 Korábbi adatok a PMA által TRESK csatornára kifejtett aktiváló hatásról	36
4. CÉLKITŰZÉSEK	38
5. MÓDSZEREK	39
5.1 Felhasznált vegyszerek	39
5.2 Plazmid konstrukciók és cRNS szintézis	39
5.3 A <i>Xenopus</i> petesejtek preparálása és mikroinjektálása	41
5.4 Két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) mérés	42
5.5 A TRESK csatorna foszforilációs állapotának vizsgálata Phos-tag™ SDS-PAGE és anti-HA immunoblot módszerrel.....	43
5.6 Adatok kiértékelése és statisztikai analízis.....	46
6. EREDMÉNYEK	48
6.1 A TRESK szerin 264 aminosav mutációi kivédik a PMA csatorna aktiváló hatását.....	48

6.2 A PMA kezelést követően az ionomycin hasonló szintre aktiválja a TRESK áramot, mint az ionofór adása önmagában.....	51
6.3 A PMA hatására az egér TRESK lényegesen kevésbé aktiválódik, mint a humán csatorna	53
6.4 A PMA a vad típusú humán TRESK csatornát nem a calcineurinon keresztül aktiválja	55
6.5 A csonkolt MARK2 kináz konstrukció koexpressziója a TRESK csatornával megszünteti a PMA hatását	56
6.6 A PMA lelassítja a TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba a calcineurin-függő aktivációt követően	59
6.7 Az “új típusú” (novel-type) protein kináz C koexpressziója a TRESK csatornával olyan K⁺ áram változásokat okoz, mint a PMA adása	60
6.8 A MARK2Δ ellensúlyozza a konstitutívan aktív PKCϵ hatását a TRESK aktivációra és visszaállási kinetikára	65
6.9 A sejtek kezelése PMA-val a TRESK fehérje defoszforilációját eredményezi.....	67
6.10 Az A2793 cloxyquin származék a TRESK csatorna állapot-függő gátlását okozza, de a cloxyquintól eltérően a defoszforilált csatornán hat jobban.....	71
7. MEGBESZÉLÉS	75
7.1 Az eredmények értelmezése – a PKC hatására létrejövő TRESK szabályozás mechanizmusának megbeszélése	75
7.2 A PKC általi TRESK szabályozás lehetséges élettani szerepe	81
7.3 A TRESK farmakológiai befolyásolására tett kísérletek.....	84
8. KÖVETKEZTETÉSEK.....	88
9. ÖSSZEFOGLALÁS	89
10. SUMMARY	90
11. IRODALOMJEGYZÉK	91
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	111
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	112

2. Rövidítések jegyzéke

4α-PDD	4 α -forbol-12,13-didekanoát (4α-phorbol 12,13-didecanoate)
AKAP150	150 kilodaltonos protein kináz A-t horgonyzó fehérje (A-kinase-anchoring protein 150)
AMP	adenozin-monofoszfát (adenosine monophosphate)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BK	magas konduktanciájú Ca ²⁺ aktivált K ⁺ csatorna (big conductance calcium-activated K⁺ channel)
[Ca²⁺]	Ca ²⁺ ionkoncentráció
DAG	diacil-glicerin
DRG	hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (kétértékű ion kelátor)
EGTA	etilén-glikol-bisz(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'- tetraecetsav (Ca ²⁺ kelátor)
ER	endoplazmatikus retikulum
EC	extracelluláris
EC₅₀	fél-maximális aktiváló koncentráció
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
h-	humán
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
IBA	isobutylalkenyl amide
IC₅₀	fél-maximális gátló koncentráció
IK	közepes konduktanciájú Ca ²⁺ aktivált K ⁺ csatorna (intermediate conductance calcium-activated K⁺ channel)
IP₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
[K⁺]	K ⁺ ionkoncentráció
kD(a)	kilodalton
K_{ir}	befelé rektifikáló K ⁺ csatorna (inwardly rectifying K⁺ channel)
KO	génhiányos (knock-out) (állat)
K_v	feszültségfüggő K ⁺ csatorna (voltage-gated/-dependent K⁺ channel)
K_{2P}	két pórusdoménnal rendelkező K ⁺ csatorna (two-pore domain K⁺ channel)
LPA	lizofoszfatisav (lisophosphatidic acid)

m-	egér (mouse)
MARK	microtubule-associated-protein/microtubule affinity-regulating kinase
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
P	pórusdomén
PCR	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PMA	forbol-mirisztill-acetát (phorbol 12-myristate 13-acetate)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethylsulfonyl fluoride)
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz lánreakció
SDS-PAGE	nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SK	alacsony konduktanciájú Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (small conductance calcium-activated K^+ channel)
TALK	TWIK-related ALkaline pH-activated K^+ channel
TASK	TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel
THIK	Tandem pore domain in a 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
TRG	trigeminális ganglion
TRP	tranziens receptor potenciál (ioncsatorna fehérje)
TRPV1	tranziens receptor potenciál vanilloid-1
TWIK	Tandem of pore domains in a Weakly Inward rectifying K^+ channel

3. Bevezetés

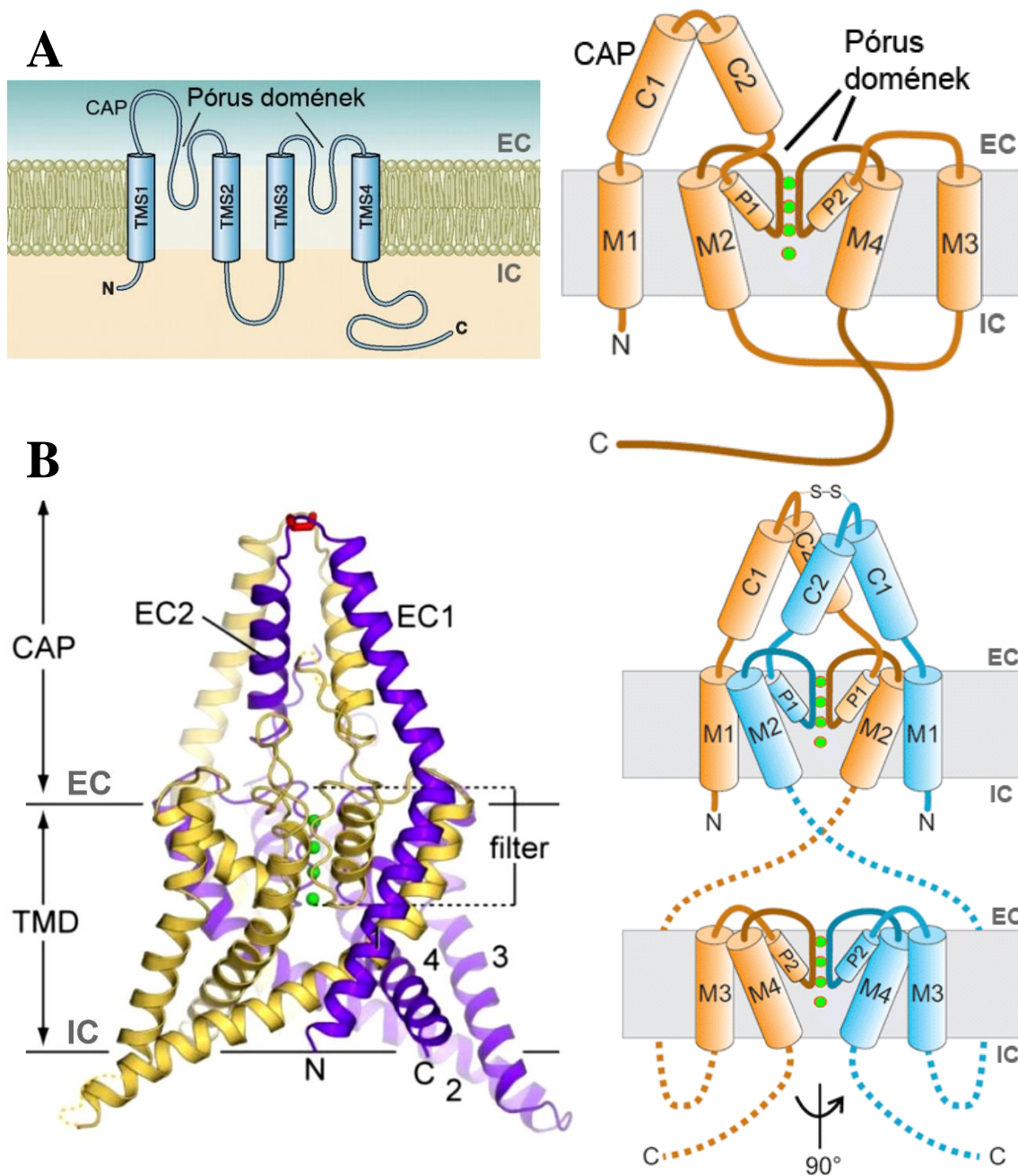
3.1 A két pórusdoménnal rendelkező (K_{2P}) háttér kálium csatornák általános jellemzése és élettani jelentőségük rövid áttekintése

3.1.1 Szerkezeti sajátosságok

A kálium csatornák több alegységből álló, lipidmembránt átérő fehérje komplexek. Meghatározó szerkezeti elemeik a transzmembrán régiók és pórusdomének. A transzmembrán szegmensek és a pórusdomének egyes aminosavai alkotják a csatorna pórusát. Ez a hidrophil útvonal a fehérjekomplex központi tengelyének megfelelően, a kettős lipidréteget egészében átérő módon, annak síkjára merőlegesen helyezkedik el és lehetővé teszi a K^+ ion átjutását a membrán egyik oldaláról a másikra. Az alegységekben található transzmembrán régiók és pórusdomének száma eltér a különböző K^+ csatorna családokban.

A ma ismert legtöbb K^+ csatorna alegység meghatározó szerkezeti eleme a szelektivitási filter régió, amelynek aminosav szekvenciája a teljes élővilágban erősen konzervált. Szintén aránylag konzervált szekvenciájú az ettől N-terminális irányban található pórus hélix, ami a szelektivitási filter szekvenciával szerkezeti egységet alkot. Ez a közös szerkezeti elem, a pórusdomén, ismétlődik térben négyszer, a csatorna tengelye körül forgásszimmetrikus elrendezésben, és alkotja a csatorna pórus (egyik) legszűkebb részét, ami elsődlegesen felelős a K^+ csatornák rendkívüli szelektivitásáért. A legtöbb K^+ csatorna családban a működő csatornát négy alegység alkotja és ezek egy-egy pórusdoménnal járulnak hozzá a szelektivitási filter kialakításához. Vagyis a K^+ csatornák többsége tetramer szerkezetű. Ezzel szemben, az értekezés tárgyát képező K_{2P} kálium csatornákra – nevüknek megfelelően – az jellemző, hogy alegységenként bennük két pórusdomén található. A K_{2P} alegységek dimer formában alkotnak működő csatornát, amiben az alegységek mindkét pórusdoménje hozzájárul a szelektivitási filter kialakításához (1. ábra).

A K_{2P} családba jelenleg sorolt csatornák 4TM/2P szerkezettel jellemezhetők, vagyis négy transzmembrán régióval rendelkeznek alegységenként [1,2], habár korán

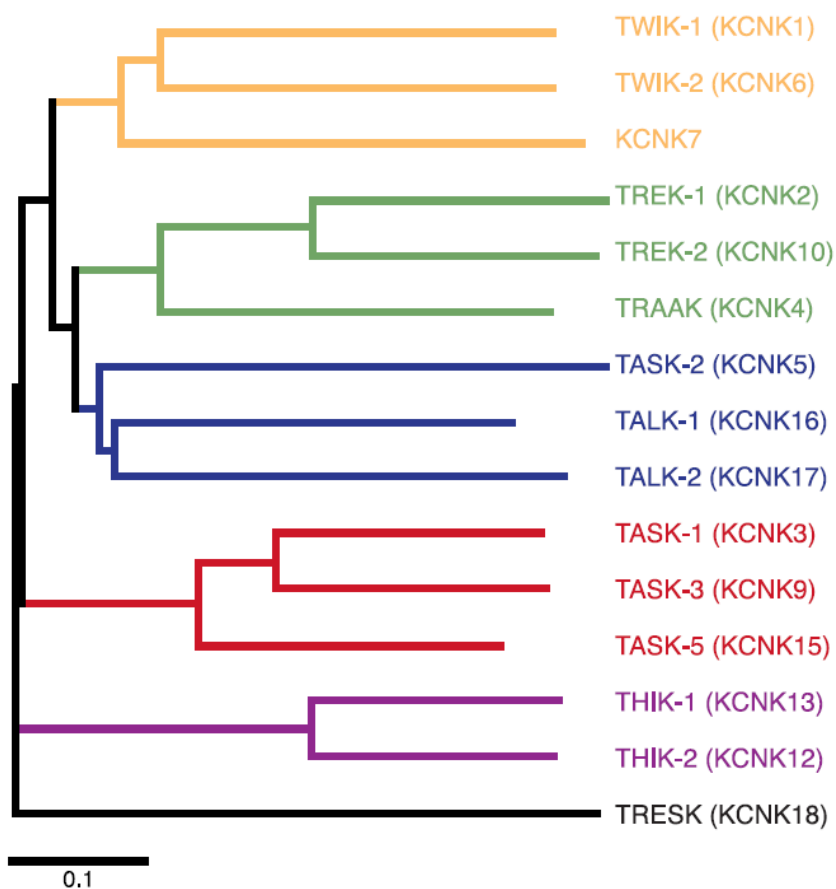


1. ábra: A K_{2P} csatornák membrántopológiája és áttekintő kristályszerkezete.

A. A K_{2P} csatornák transzmembrán topológiája 4TM/2P szerkezetet mutat, vagyis a négy transzmembrán szegmens (TMS vagy M1-M4) között két pórusdomén helyezkedik el. Jellemző szerkezeti elemek még az első extracelluláris hurok által alkotott ún. sapka domén (CAP) és az intracelluláris N- és C-terminális, illetve a hurok régió. (Módosítva az [1], [3] közleményekből.)

B. A TREK-2 csatorna sematikus kristályszerkezete térben ábrázolja a szerkezeti elemeket. A két alegység sárga, illetve lila/kék színű. A négy K^+ kötőhely (zöld) körül a szelektivitási filter szekvencia (zsinór reprezentáció), illetve attól N-terminális irányban (térben a pórustól távolabb) a ferde lefutású rövid pórushélix (szalag-, vagy henger reprezentáció, P1 és P2) látható. A bal oldalon az eredeti kristályszerkezet leképezése, a jobb oldalon az ennek megfelelő sematikus ábra található. A jobb oldali alsó és felső panel két 90° -ot bezáró síkon érzékelteti a szerkezeti elemek hozzávetőleges forgásszimmetriáját. TMS, TMD vagy M1-4: transzmembrán szegmensek vagy domén; N: N-terminális, C: C-terminális; (E)C1 és 2: extracelluláris hélixek a sapka doménben; EC: extracelluláris, IC: intracelluláris (Módosítva a [3], [4] közleményekből.)

leírták, hogy élesztőgombában létezik ettől eltérő szerkezetű, alegységenként nyolc transzmembrán szegmással és két pórusdoménnal rendelkező csatorna is (8TM/2P, [5]). Mindenesetre, ma biztosan tudjuk, hogy a 4TM/2P csatornák rendkívül elterjedtek az élővilágban, megtalálhatók az összes fontos modell organizmusban, nem csak az élesztőgombában [6], de számos alacsonyabb rendű állatfajban, pl. a *Caenorhabditis elegans* féregben [7], *Drosophila melanogaster* ecetmuslicában [8], és a növényekben is [9]. Emberben tizenöt féle háttér K^+ csatorna alegységet klónoztak, amelyeket szerkezeti és funkcionális hasonlóságok alapján hat alcsaládba oszthatunk (2. ábra).



2. ábra: Az emberi K_{2P} csatornák dendrogramja.

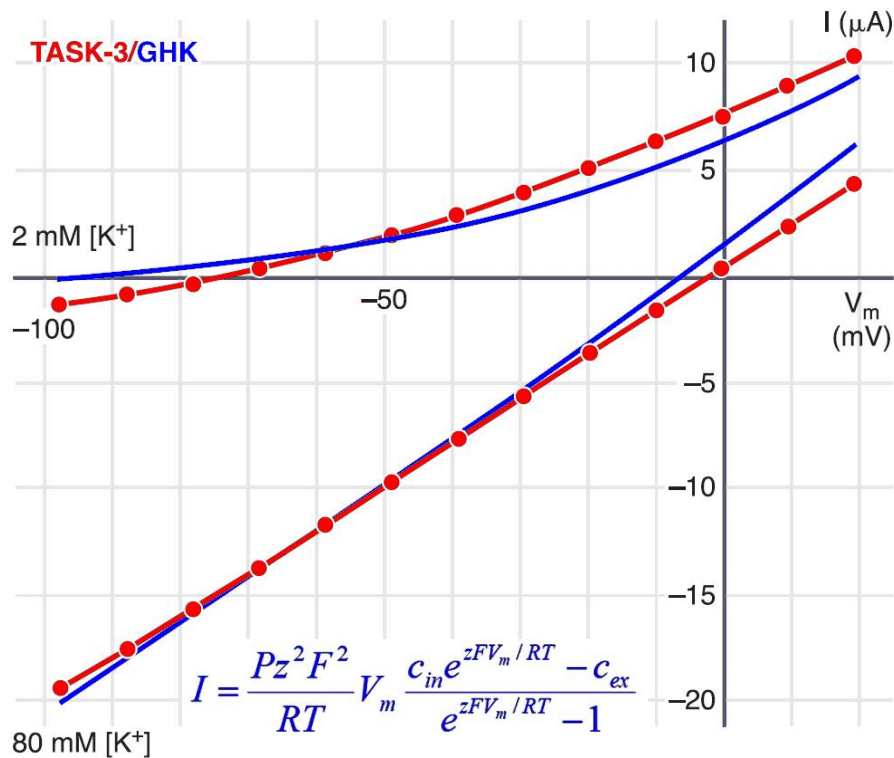
A különböző színek az alcsaládokat jelölik. A csatorna leggyakrabban használt hagyományos elnevezése után feltüntettük a gén nevét is, amelyben a sorszám egyben megfelel a K_{2P} csatorna (fehérje) alegységek számozásának. A dendrogram a Clustal W programmal készült. A dendrogram alatti lépték aminosavanként átlagosan 0.1 helyettesítésnek megfelelő szekvencia különbséget jelöl. (Módosítva az [1] közleményből.)

A K_{2P} csatornák szerkezeti változatosságát a különböző géneken kívül többféle mechanizmus is növeli. Munkacsoportunk mutatta ki elsőként, hogy alcsaládon belül létrejöhet heterodimerizáció a különböző alegységek között [10]. Mára teljesen elfogadottá vált, hogy a TASK-1 és TASK-3 alegységek egymással is működőképes csatornát alkotnak, amelynek tulajdonságai eltérnek a TASK-1 és TASK-3 homodimerektől egyaránt. TASK-1/TASK-3 heterodimerek számos szövetben kialakulnak *in vivo*, pl. jelentős szerepet játszanak a glomus caroticum pH érzékelésében [11-13], vagy a motoneuronok ingerlékenységének szabályozásában [14-16]. Később nyilvánvalóvá vált, hogy az alcsaládon belüli heterodimerizáció nem korlátozódik a TASK-1 és -3 csatornákra, hanem inkább általános jelenség, ami megfigyelhető a THIK-1 és -2 esetén [17], és a TREK alcsalád mindhárom tagja között páronként [18-20]. Természetesen többször felmerült a heterodimerizáció lehetősége különböző alcsaládokba tartozó alegységek között is. A TWIK-1 és TREK (vagy TASK) alegységek heteromerizációját [21-23] a tudományos közvélemény mind a mai napig fenntartással fogadta, egy munkacsoporton kívül másnak nem sikerült megerősítenie. A közelmúltban a TRESK-TREK alegység kombináció tekintetében közöltek olyan eredményeket, amelyek szerint a távoli rokonságban álló alegységek működő heterodimer csatornát alkotnak, ami a homodimereknél elő nem forduló tulajdonság kombinációkat örököl a különböző alegységektől [24]. A heterodimerizáción kívül ismert, hogy splice variánsok [25-28] és alternatív transláció iniciáció [24,29,30] szintén tovább fokozhatja a K_{2P} csatornák sokszínűségét.

3.1.2 Elektrofiziológiai tulajdonságok

A K_{2P} csatornák háttér (csurgó, leak) kálium áramot hoznak létre. A csatornák aktivitása kevéssé függ a membránpotenciál értékétől, vagyis a feszültség-áram összefüggés jó közelítéssel megfelel a Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) áramegyenletnek (3. ábra). Szimmetrikus K^+ megoszlás esetén, mikor a membrán két oldalán a K^+ koncentráció megegyezik, akkor az áram egy origón átmenő egyenes formájában követi a feszültség változását. Ha az egyik oldalon nincs töltéshordozó (K^+), akkor a függvény a vízszintes tengely megfelelő irányában a tengelyhez simul, hiszen a töltéshordozótól

mentes oldalról nem folyhat áram a membránon keresztül egyik feszültség értéken sem. Másként fogalmazva ez azt jelenti, hogy elvi okokból látszólagos rektifikálás (egyenirányítás) jelensége lép fel akkor, ha a töltéshordozó koncentrációja a két oldalon eltér.



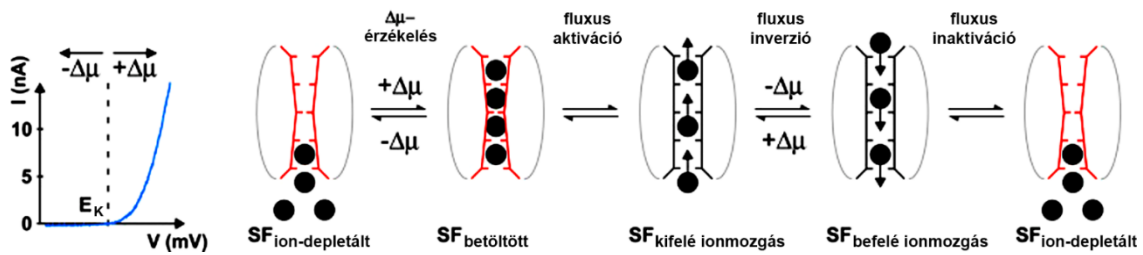
3. ábra: A TASK-3 csatorna áramának feszültségfüggése 2 és 80 mM EC [K⁺] esetén.

A piros mérési pontok egy olyan *Xenopus* petesejt K⁺ áramait mutatják, ami nagy mennyiségben TASK-3 csatornát expresszál. Az áram amplitúdó körülbelül százszorosa a nem expresszáló petesejt endogén K⁺ áramának. Ha az extracelluláris K⁺ koncentráció 80 mM, akkor a feszültség-áram összefüggés jó közelítéssel egy origón átmenő egyenes. Ha az EC [K⁺]-ot 2 mM-ra csökkentjük, akkor a negatív feszültségtartományban a nagy befelé irányuló áram megszűnik és a görbe jó közelítéssel a vízszintes tengelyhez simul. A kék görbék a GHK áram egyenlet (ld. alul kék színnel) alapján illesztett összefüggések, amelyek közelítik a mért áramok nagyságát. A piros mérési pontok a TASK-3 áram azonnali komponensének felelnek meg (2.4 ms-mal a feszültséglépés kezdetét követően), a későbbi áram feszültségfüggése valamivel nagyobb (nem mutatom). (Módosítva az [1] közleményből.)

A teljes sejt (whole cell) mérési körülmények között mért K_{2P} feszültség-áram összefüggések általában aránylag jól közelítik a GHK elméletből adódó eredményeket, de nem felelnek meg annak pontosan. Egyes csatorna típusoknál kifelé rektifikálás figyelhető meg szimmetrikus [K⁺]-ban, pl. jellemzően a TREK csatornáknál [31], míg

mások enyhén befelé egyenirányítanak (mint pl. a TWIK csatornák, nevüknek megfelelően: Tandem of pore domains in a Weakly Inwardly rectifying K^+ channel, [32]). Egyes K_{2P} csatornáknál enyhe feszültségfüggés jelentkezik, ami megjelenhet idő függvényében aktiválódó áram komponensként [33], illetve esetenként lassú inaktiváció is előfordul [34]. A csatorna működés egyes további jellemzői csak egyedi csatorna (single channel) mérésekben elemezhetők. Az egyedi csatorna mérések pl. arra utaltak, hogy a TREK csatornáknál a makroszkópos áram kifelé rektifikálásáért döntően a csatorna aktivitás változása felelős, az egyedi csatorna áram viszont nem mutat kifelé rektifikálást [35-37]. Habár ezek az elektrofiziológiai részletek egyértelműen kimérhetők kísérletes rendszerekben, kérdés marad, hogy milyen mértékben befolyásolják a csatornák élettani szerepét, ami vélhetően leginkább a robosztus háttér K^+ áram komponensen alapul.

A feszültségfüggés kis mértékéből nem következik, hogy a K_{2P} csatornák árama passzív módon mindig állandó lenne. Ehelyett a háttér K^+ áram rendkívül érzékeny a kísérleti körülményekre, egyes esetekben a csatornafehérje akár szenzor funkciót is betölthet: pl. EC vagy IC pH, hőmérséklet vagy membránfeszülés érzékelése a fiziológiánál releváns tartományban [38-45]. Emellett leggyakrabban intracelluláris jelátviteli utak általi csatorna szabályozás is érvényesül (ld. alább). Az élőben jellemző körülményekhez képest a K_{2P} csatornák környezete különbözhet az izolált sejtekben végzett mérés esetén, de talán még ennél is jelentősebb változást okoz a csatorna aktivitás mérése kivágott membrán foltban. Ebben az *in vitro* sejtmentes rendszerben a háttér K^+ csatornák áramának jelentős rektifikáló tulajdonságát írták le (pl. TASK-3 esetében hozzávetőlegesen 10-szeres rektifikációs koefficiens), amelynek magyarázatára a K^+ -fluxus-csatolt kapuzási modellt dolgozták ki [46,47]. Ebben a modellben a rektifikáció oka a pórus K^+ kötő helyeinek telítődése (kifelé irányuló áramnál) vagy kiürülése (befelé áramnál), ami visszahat a csatorna konformációra (4. ábra). A mechanizmus hozzájárulhat a háttér K^+ csatornák GHK elmélettől eltérő feszültség-áram karakterisztikájához *in vivo* is, különösen a TREK alcsalád tagjainál.



4. ábra: Az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás mechanizmusa.

Ha a membránpotenciál erősen negatív, egyértelműen negatívabb, mint az egyensúlyi potenciál (E_K), akkor a szelektivitási filter (SF) depletált állapotban van és a csatorna nem (vagy kevéssé) vezet. Ha ezután a membránpotenciál pozitívabbá válik, mint az E_K értéke, akkor az elektrokémiai potenciál változás ($\Delta\mu$) hatására konformáció változás jön létre, miközben a pórus K^+ kötőhelyei telítődnek, azonban a csatorna még nem kerül nagy vezetőképességű állapotba. A kötőhelyek telítődése teszi lehetővé a következő lépésben a nagymértékű kifelé irányuló ionmozgást a póruson keresztül. Ha ilyenkor a membránpotenciál újra az E_K érték alá csökken, akkor létrejön egy gyors áramirány változás ("fluxus inverzió"), azonban ez az áram nagyon gyorsan lecseng, mert a pórus K^+ kötőhelyei kiürülnek, és a csatorna visszatér a nem (kevésbé) vezető állapotába. (Módosítva a [46] közleményből.)

3.1.3 Szabályozási mechanizmusok

A K_{2P} csatornák aktivitása ugyan kevéssé függ a membránpotenciál változásoktól, azonban ezek a csatornák rendkívül szerteágazó és alcsaládonként egyedi módon szabályozódnak feszültségtől független mechanizmusokkal. A már fentebb is említett fizikokémiai környezet hatása, ami csatorna szinten szabályozásnak tekinthető, de a teljes szervezet szempontjából inkább érzékelő mechanizmusként fogható fel, több esetben közvetlenül a csatornafehérjén érvényesül. Az extra- vagy intracelluláris pH-érzékenység nagy része magyarázható volt több csatorna típus esetén is egy-egy aminosav oldallánc protonációjával [33,40,48-51]. Emellett az utóbbi időben több tanulmány is arra a következtetésre jutott, hogy a TREK alcsaládban jellemző mechanoszenzitivitás szintén elsősorban közvetlen csatornán érvényesülő hatás [45,52,53]. A csatornafehérje közvetlenül érzékeli a membránfeszülés változásait, és ehhez nem elengedhetetlen pl. a citoskeleton és a csatornafehérje interakciója. (Valószínűleg azonban ez utóbbi interakció is létrejöhet és módosíthatja a mechanoszenzitivitást [54].) A pH és mechanikai változások hatása jól detektálható kivágott membrán foltban is, csakúgy mint a lipidkörnyezet bizonyos változásainak hatása, pl. a TREK család tagjainak nagyfokú aktivációja arachidonsav és más telítetlen zsírsavak által [55-57]. Ez is összhangban van

azzal az elképzeléssel, hogy ezek a tényezők közvetlenül a csatornafehérje komplexen fejtik ki a hatásukat, hiszen a kivágott membrán folt mérés sejtmentes rendszerben történik, amelyben a mérőoldattal történő nagyfokú perfúzió eltávolítja a citoplazma komponenseket a membrán folt eredetileg intracelluláris oldaláról.

A fizikokémiai faktorok közül talán legkevésbe a TREK csatornák hőmérsékletfüggésének hatásmechanizmusát értjük. A 22 és 42 fok közötti tartományban a TREK csatornák árama növekszik a hőmérséklet függvényében [41,58-60], sokkal meredekebben ($Q_{10} \approx 10$), mint a többi K^+ csatornáé, azonban ezeknek a K_{2P} csatornáknak az érzékenysége azért valamivel kisebb, mint a hőmérséklet érzékelésben közismerten szerepet játszó TRP csatornáké ($Q_{10} \approx 20$). Mindenesetre a TREK csatornák nagyfokú hőmérsékletfüggésének valószínűleg jelentősége van a fiziológias hőmérséklet érzékelésében [60,61]. Szemben a fent tárgyalt egyéb fizikokémiai faktorokkal azonban, a K_{2P} csatornák hőmérsékletfüggése elvész a membrán folt kivágásakor, ami megkérdőjelezi, hogy ebben az esetben közvetlen csatorna határról van-e szó. Érdekes módon a hőmérsékletfüggés minden vizsgált heterológ expressziós rendszerben megfigyelhető teljes sejtben, ami arra utal, hogy ubikviter az a citoplazma komponens, ami a TREK csatornák hőmérséklet érzékelését lehetővé teszi.

A K_{2P} csatornákat ezen felül intracelluláris jelátviteli utak is szabályozzák és ezek a mechanizmusok sokszor olyan nagy mértékben befolyásolják a csatorna aktivitást, hogy az alapvetően meghatározza a membránpotenciál változásait és ezáltal a sejt élettani működését. Különösen a TREK és TASK alcsaládok esetén ismertek olyan jelátviteli mechanizmusok, amelyek a csatorna aktivitást többszörösére vagy töredékére képesek változtatni, és ezeket a jelátviteli utakat több független munkacsoport is részletesen vizsgálta, általános jelentőségüknek megfelelően.

Ilyen általános jelentőségű szabályozó mechanizmus a TASK-1 és TASK-3 csatornák gátlása a G_q -fehérje kapcsolt receptorok ingerlése során. Különböző receptor típusok ingerlésének hatására is létrejön a gátlás, ilyen pl. az M_1 vagy M_3 muszkarinos acetilkolin receptor [62,63], a TRH-receptor, a metabotrop glutamát receptor [64], illetve az angiotenzin receptor [65]. A hatás kifejlődik a legkülönbözőbb heterológ expressziós rendszerekben is, ami a szabályozási mechanizmus általánosságára utal. Munkacsoportunk elsőként közölte, hogy a gátlási mechanizmus a foszfolipáz C enzim aktiválódásán alapul, de nem az inozitol-triszfoszfát (IP_3)-indukált kalcium jel és a

protein kináz C hatására jön létre [62]. Ezt az eredményt a tudományos közvélemény több mint egy évtizedig vitatta [66-69], mígnem végül általános elfogadást nyert [70-72]. A jelenleg elfogadott nézet szerint a foszfolipáz C terméke, a diacilglicerin (DAG) közvetlen hatást fejt ki a csatornára, és nem a szubsztrát foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát fogyása felelős a gátlásért [71,72]. A TASK csatornák gátlásához (a G_q kapcsolt receptorok ingerlésekor) elengedhetetlen a csatorna intakt C-terminális régiója. A C-terminális proximális részén található hat aminosav cseréje a TREK-1 megfelelő szekvenciájára teljes mértékben kivédte a receptor-függő szabályozást [73].

A TREK-1 és TREK-2 csatornát a G_s és G_q fehérje kapcsolt receptorok ingerlése egyaránt gátolja [57,74,75]. A hatásokért döntően a protein kináz A (PKA), illetve protein kináz C (PKC) felelős (megfelelően), amelyek foszforilálják az intracelluláris C-terminális régiót és ezáltal gátolják a csatorna aktivitást. A PKA/PKC által foszforilált szerin aminosavakat az AMP-függő kináz (AMPK) is tudja foszforilálni, ami megteremti a lehetőséget, hogy a TREK aktivitás egyes sejtekben a metabolikus háttérnek megfelelően változzon [76]. (A TRAAK csatornát a PKA és a PKC nem szabályozza a TREK-1-hez és TREK-2-höz hasonló módon [55] és ennek megfelelően a TRAAK árama nem érzékeny G_q -kapcsolt (M_1 muszkarinos acetilkolin) receptor ingerlésre [77].)

A részletesen vizsgált TASK és TREK csatornák esetén többféle citoplazmatikus fehérje interakciós partnert is azonosítottak. Ezek majdnem kivétel nélkül a csatornák C-terminális régiójához kötődnek. A TASK-1 és TASK-3 C-terminálisának utolsó 5 aminosavához (RRSSV a TASK-1-ben) kapcsolódik a 14-3-3 adapter fehérje, ami elfedi az endoplazmás retikulum retenciós szignált, így gátolja a koatomer protein COPI kötődését és fokozza a csatorna beépülését a plazmamembránba, vagyis az expresszió szintjét [78-80]. A TASK csatornák C-terminálisához kötődik még a p11 (S100A10) adapter protein [81,82] és a syntaxin-8 [83], amelyek különböző mechanizmussal okoznak endoplazmatikus retikulum retenciót és csökkentik a csatorna expressziót [80].

A TREK csatornák interakciós partnerei eltérőek, azonban ezek is jellemzően a C-terminális régióban található szekvencia motívumokhoz kapcsolódnak. Az AKAP150 állványfehérje kötődése a TREK-1 csatornához aktivációt hoz létre, ami megnyilvánul a kifelé rektifikáló karakterisztika háttér áramhoz hasonlatossá válásában, illetve abban, hogy a TREK-1 áram ekkor már nem fokozható tovább sem membránfeszüléssel, sem pedig arachidonsav adásával [84]. Egy másik interakciós partner, a mikrotubulus-

asszociált fehérje Mtap2, a TREK-1 (és TREK-2) C-terminális egy eltérő részéhez kötődik és nem befolyásolja a csatorna aktivitást, de megnöveli a csatorna számot a plazmamembránban [85].

3.1.4 Általános élettani és orvosi jelentőség

Míg a feszültségfüggő K^+ csatornák (K_V család) döntően a depolarizációs folyamatokat ellensúlyozzák, a befelé rektifikáló K^+ csatornák (K_{IR} család) pedig főként a nyugalmi membránpotenciál stabilizálásában fontosak, addig a K_{2P} csatornák mindkét hatást kifejtik, a membránpotenciáltól kevésbé függő működésük miatt. A K_{2P} csatornák széles körben kifejeződnek a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben egyaránt és a rendkívül kiterjedt és sokrétű élettani szerepük átfogó tárgyalása meghaladja a jelen értekezés kereteit (ld. az [1] és [86] összefoglalókat, illetve a *Pflugers Archiv* folyóiratban (2015, 467(5):865-1142) megjelent összefoglaló közlemény sorozatot a témában). Ezért itt csak néhány kiragadott példán keresztül érzékeltetem a K_{2P} csatornák élettani és orvosi jelentőségét.

A TASK és TREK alcsaládok tagjainak széleskörű kifejeződése a központi idegrendszerben hozzájárul a neuronok aktivitásának általános szabályozásához. Bizonyítottnak tekinthető, hogy a csatornák aktiválása és általános hiperpolarizáló hatása jelentős mértékben hozzájárul a párolgó folyadék anesztetikumok orvosi gyakorlatban jól ismert hatásaihoz. Állatkísérletes modellben a csatornák génmódosítással történő kiiktatása nagymértékben csökkenti az altatószerek (pl. halotán, izoflurán) hatását [87,88]. Mindemellett a TREK csatornák szerepet játszanak a viselkedésbeli aktivitási szint és kedélyállapot alakításában is. A TREK-1 génkiütés depresszió-rezisztens fenotípust eredményez [89] és a TREK csatornák gátlása valószínűleg hozzájárul a fluoxetin terápiás hatásához [4,90,91].

A TASK és TALK alcsalád tagjai több esetben pH érzékelőként működnek. A perifériás kemoreceptorok pH érzékenységének meghatározó tényezője a TASK-1 és TASK-3 csatornák gátlása az extracelluláris savanyodáskor [12,13]. A háttér K^+ áram csökkenése depolarizációt és fokozott transzmitter leadást eredményez a glomus caroticum sejtjeiben. A TASK-1 és TASK-3 csatornák nagyfokú pH érzékenységéért

főként egy extracelluláris elhelyezkedésű hisztidin oldallánc protonálódása felelős [33,40]. A TASK csatornák egy másik, ismeretlen gátlási mechanizmusa emellett hozzájárul a perifériás kemoreceptor oxigén érzékeléséhez is [11,12]. Az agytörzsben található centrális kemoreceptor $p\text{CO}_2$ iránti nagyfokú szenzitivitása, a légzésszabályozás másik fontos eleme, közvetve szintén az extracelluláris pH érzékelésen alapul. Azonban a TASK-1 és TASK-3 csatornák génkiütése nem befolyásolta jelentősen a $p\text{CO}_2$ növekedésre adott légzési választ. Viszont a TALK alcsaládba tartozó, szintén pH-érzékeny TASK-2 eltávolítása a választ jelentősen tompította, és ezt a csatornát sikerült kimutatni a reakcióban szereplő anatómiai struktúrában, a nucleus retrotrapezoideusban [92,93].

A TASK-1 csatornáról munkacsoportunk írta le elsőként, hogy nagy mennyiségben kifejeződik a mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjeiben és az angiotenzin receptor ingerlés következtében létrejövő gátlása hozzájárul a sejtek fokozott aldoszteron termeléséhez [65]. A csatorna génkiütése egérben primer hiperaldoszteronizmust okoz [94] és a TASK-1-nek megfelelő KCNK3 gén variánsai emberben hiperaldoszteronizmussal és hipertóniával asszociáltak [95]. A TASK-1 csatornáról a közelmúltban másik orvosi vonatkozás is felmerült, azt találták, hogy a csatorna bizonyos mutációi öröklődő pulmonális hipertóniát okoznak [96-99]. A TASK-1 génhiányos egérben pulmonális hipertenzió nem jelentkezik, mert a pulmonális artéria vaszkuláris simaizomsejt K^+ csatorna összetétele eltér az emberétől [100,101]. Jelenleg kiterjedt érdeklődés övezi, hogy a TASK-1 csatorna farmakológias aktiválását fel lehet-e használni terápiás céllal a pulmonális hipertónia rendkívül heterogén betegségcsoportjának egyes típusaiban [97,99].

$\text{K}_{2\text{P}}$ csatornák szerepelnek a szív elektrofiziológiájában is. A TASK-1 csatorna emberben főként a pitvarizomzatban fejeződik ki és potenciális célpont a pitvarfibrilláció kezelésében [102-105]. A mechanoszenzitív TREK-1 csatorna jelenléte a pitvari és kamrai munkaizomzatban felveti a lehetőségét, hogy a csatorna szerepet játszik a mechanoelektromos visszacsatolás (feedback) jelenségben [104,106]. Ennek során a szívizomzatban létrejövő mechanikai változások (pl. a falfeszülés mértéke) visszahat a membránpotenciálra és ezáltal a kifejlődő kontrakció erejét módosítja.

3.1.5 A K_{2P} csatornák szerepe a fájdalomérzésben

A fájdalom kezelése az orvosi gyakorlatban nem tekinthető véglegesen megoldottnak, különösen egyes olyan speciális kórképekben jelentkezik nehezen kezelhető fájdalom, mint pl. a neuropátiás fájdalom, a migrén vagy a rosszindulatú daganatokhoz társuló fájdalom típusok. Ezekben az esetekben az ismert fájdalomcsillapító eljárások gyakran nem vezetnek megfelelő eredményre. Emiatt továbbra is intenzív kutatás folyik újabb fájdalomcsillapító gyógyszerek/eljárások kifejlesztésére. A primer szenzoros neuronokban jelentős mértékben K_{2P} csatornák felelősek a membránpotenciál és az ingerlékenység stabilizálásáért, és napjainkban egyre többen vetik fel a kérdést, hogy ezeknek a csatornáknak az aktiválásával milyen fájdalomcsillapító hatás érhető el [2,107-113].

A kérdés megválaszolását nehezíti a primer szenzoros neuronok – és ezen belül a fájdalomérzésért felelős szubpopuláció – heterogenitása, ami érinti a sejtekben kifejeződő K_{2P} csatorna készletet is, ahogy arra az utóbbi időben a legmodernebb eljárások, mint pl. az egyedi sejt RNS szekvenálás rámutattak [114,115]. A rendkívül komplex mintázatot tükröző mRNS expresszió szintű adatok azonban korántsem feleltethetők meg egyértelműen a csatornafunkciónak. A fehérjeexpresszió nem mindig korrelál az mRNS-sel és egy-egy csatornatípus jelentősége mindig erősen függ az adott sejtípusban kifejeződő egyéb komponensek, illetve azok áramának részarányától. Összességében tehát azt mondhatjuk, hogy a K_{2P} csatornák szenzoros működésben betöltött szerepéről alkotott kép még képlékeny, folyamatosan változik és jelenleg gyorsan fejlődik.

Kang, D. és Kim, D. egyik kezdeti vizsgálata során, amelyben a hátsó gyöki ganglionból izolált neuron sejttesteket hozzávetőleges méretük szerint szelektálták, egyedi csatorna (single channel) vezetőképességük alapján azonosították a K_{2P} csatorna típusokat több mint 250 membrán foltban [116]. Ez alapján sorrendet állítottak fel a csatornák funkcionális expressziója tekintetében. Testhőmérsékleten (37 °C) a következő sorrendet kapták: TREK-2 (69%), TRESK (16%), TREK-1 (12%) és TRAAK (3%). Szobahőmérsékleten (24 °C) a vezetést a TRESK csatorna vette át, mivel a termoszenzitív TREK-2 (és -1) aktivitása visszaesett [116]. Mások hátsó gyöki ganglionból végzett valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció (real-time RT-PCR) módszerrel a következő relációkat figyelték meg az mRNS kifejeződés szintjén: TRESK > TRAAK >

TREK2 = TWIK2 > TREK1 = THIK2 > TASK1 > TASK2 > THIK1 = TASK3 [117]. Ugyanez a munkacsoport később immuncitokémiával a TREK-2 fehérje magas expresszióját mutatta ki C-típusú rosttal rendelkező nociceptor neuronok sejttestjeiben, és siRNS technikával visszaszorított TREK-2 expressziójú neuronokban depolarizációt igazolt áramzár (current clamp) patch clamp méréssel [118]. Több független tanulmány megerősítette a TREK-2 szerepét a kis sejttesttel és C-típusú rosttal rendelkező (izolektin B4 pozitív, IB4⁺) neuronok membránpotenciáljának kialakításában [42,119,120]. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a fájdalomérző primer szenzoros neuronokban a TREK alcsalád tagjai és a TRESK csatorna jelentős meghatározói az ingerlékenység szabályozásának.

Royal P. és mtsai. 2019 januárban közölt munkája összefüggést teremt a különböző alcsaládba tartozó és ennek megfelelően alacsony (<20%) aminosav szekvencia azonosságot mutató TRESK és TREK csatornák között [24]. Azt találták, hogy a TRESK alegység heterodimert képez a TREK-1 és TREK-2 csatorna alegységekkel. A heterodimerizáció lehetővé teszi, hogy a TRESK csatorna bizonyos funkcióvesztő mutációi domináns negatív hatást fejtsenek ki nemcsak az ép alléltól származó vad típusú TRESK alegységekre, hanem a TREK alegységekre is. (Ezeknél a mutánsoknál kereteltolódás (frameshift) miatt alternatív transzláció iniciációval kóros TRESK C-terminális fehérjerészlet alakul ki.) A domináns-negatív hatás olyan mértékben csökkenti a szenzoros neuron háttér K⁺ csatorna készletét, amit az már máshogy nem tud kompenzálni, és az idegsejt kórosan magas aktivitását, akciós potenciál frekvenciáját eredményezi. Feltételezésük szerint ez a trigeminális ganglion (TRG) neuronokban létrejövő mechanizmus felelős a familiáris migrén kialakulásáért azokban a családokban, amelyek a megfelelő (nagyon ritka) TRESK kereteltolódásos mutációt hordozzák [24].

3.2 A TRESK (K_{2P}18) csatorna korábban megismert tulajdonságai

3.2.1 A TRESK helye a K_{2P} háttér K⁺ csatorna családban

A TRESK (TWIK-Related Spinal Cord K⁺ Channel; K_{2P}18.1; KCNK18 gén) a két pórusdoménnal rendelkező K⁺ csatornák családjába tartozik és a TRESK alcsalád egyetlen tagja [121,122]. A humán TRESK 384, az egér csatorna pedig 394 aminosavból áll. A TRESK a gerincesek evolúciójának korai szakaszában már egyértelműen elkülönült a többi K_{2P} csatornától – ennek megfelelően halakban is azonosítható [1,123] – azonban egyes kezdeti felvetésekkel [124] ellentétben az eddig vizsgált fajokban génduplikáció nem történt, tehát TRESK-2 gén nem létezik. A TRESK csatorna követi a K_{2P} családra jellemző 4TMS/2P topológiát, azonban néhány egyedi szerkezeti vonással is rendelkezik. A TRESK C-terminális régiója jóval rövidebb (kb. 30 aminosav), mint a többi K_{2P} csatorna típusé (ahol a C-terminális akár 120 aminosav hosszú is lehet). Ez azért figyelemre méltó szerkezeti különbség, mert a többi csatornánál a szabályozó mechanizmusok jellemzően a C-terminálison konvergálnak, aminek legnagyobb része a TRESK csatornából hiányzik. Mindemellett azonban a TRESK második és harmadik transzmembrán szegmense között található intracelluláris hurok régió jóval hosszabb (kb. 130 aminosav), mint a csak néhány (<30) aminosavból álló összekötő szakasz az egyéb K_{2P} csatornáknál. Az eddig azonosított TRESK szabályozó mechanizmusok mindegyikének ez a hurok régió a célpontja.

A TRESK csatorna sajátos expressziós profilt mutat. Szemben a kiterjedten kifejeződő TREK és TASK csatornákkal, a TRESK igen specifikusan csak néhány szövetben expresszálódik jelentős mértékben. Ugyan elsőként humán gerincvelőből klónozták [121], munkacsoportunk pedig egér kisagyból [122], (a harmadik munkacsoportnak egér heréből sikerült amplifikálnia [124]), azonban ez kevéssé tükrözi az élettani szempontból lényeges olyan szöveteket, amelyekben a csatorna tényleg számottevő mértékben kifejeződik. Mai ismereteink szerint a csatorna legfontosabb előfordulási helye a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok, amelyekben a primer szenzoros neuronok expresszálják [116,125,126]. A trigeminális ganglionban a TRESK mRNS kifejeződésének mértéke még a hátsó gyöki ganglionban tapasztalható magas szintű expressziót is kb. 3-szorosan meghaladja [115]. Emellett megtalálható az autonóm

idegrendszer bizonyos szenzoros és effektor neuronjaiban, mint pl. a nervus vagus ganglion nodosumában vagy a szimpatikus idegrendszerhez tartozó ganglion cervicale superiusban [127,128]. Ezeken kívül még néhány helyen kimutatták, mint pl. a retina egyes ganglion sejtjeiben [129], azonban ezek a további itt fel nem sorolt lokalizációk módszertani szempontból kérdésesek, illetve független megerősítésre várnak.

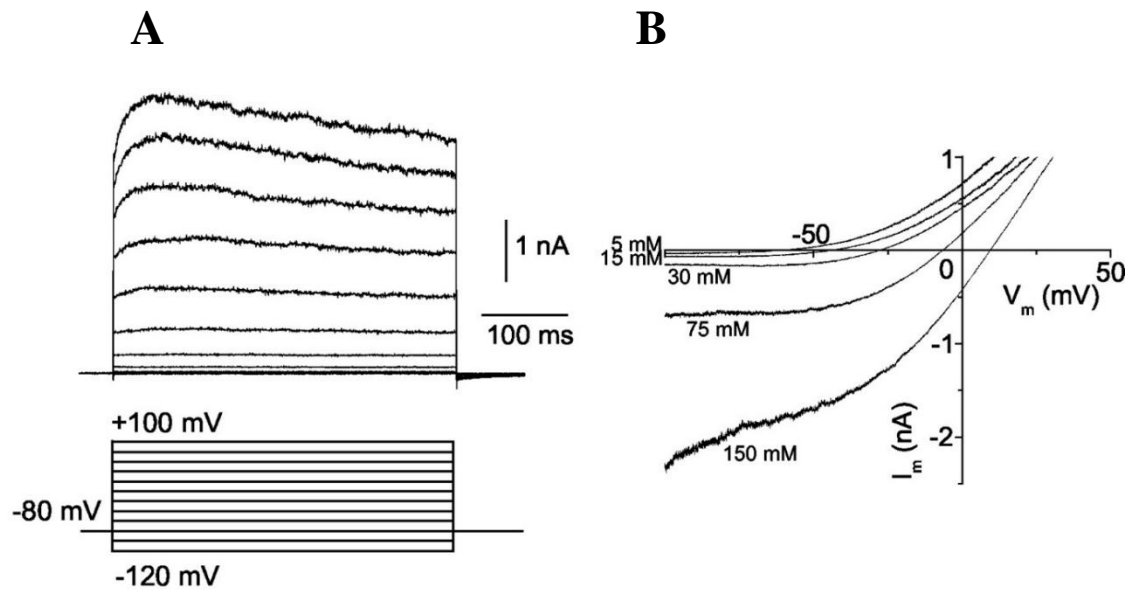
Az egyik munkacsoport a humán TRESK csatornát a primer szenzoros neuronokban a legszelektívebben expresszálandó K^+ csatornának találták az összes létező K^+ csatorna típus közül RNS szekvenálás módszerrel, összehasonlítva az agyi és több perifériás szöveti expressziós szinttel [130,131]. (Az összes ioncsatorna közül – 304 féle ioncsatorna gén expresszióját detektálták a trigeminális ganglionban és 299 féléét a hátsó gyöki ganglionban – a TRESK a második legszelektívebben expresszálandó ioncsatornának bizonyult mindkét szövetben, a $Na_v1.8$ (SCN10A) feszültségfüggő Na^+ -csatorna után [130].) Egyedi sejt RNS szekvenálás eredmények szerint, a TRESK a polimodális nociceptorok NP1 és NP2 osztályában fejeződik ki, vagyis azokban a fájdalomérző neuronokban, amelyek a Mas-rokon G-fehérje-kapcsolt receptor D és A3 (Mas-related G-protein-coupled receptor D and A3 (Mrgprd és Mrgpra3)) marker fehérjéket expresszálandó, megfelelően. A TRESK mRNS szintén megtalálható az NF1 osztályú alacsony küszöbű mechanoreceptor neuronokban, amelyek neurofilamentum nehéz lánc (Nefh) pozitívak és a NECAB2 (N-terminal EF-hand calcium binding protein 2) kifejeződésével jellemezhetők [114,115].

Amíg a TRESK mRNS expresszióról aránylag pontos ismeretekkel rendelkezünk, a TRESK fehérje szubcelluláris lokalizációja kevésbé ismert. A TRESK fehérjét kimutatták a primer szenzoros neuron sejttestekben immunhisztokémiai módszerekkel [126,132]. Kérdés marad azonban, hogy a csatorna jelen van-e a pszeudounipoláris neuron centrális és/vagy perifériás nyúlványában is. Nyilvánvaló, hogy ez a kérdés alapvetően befolyásolja a TRESK lehetséges élettani funkcióját. A perifériás végződésben az inger érzékelése történik, az itt található K^+ csatorna az inger hatására létrejövő depolarizációt mérsékelheti és ezáltal a neuron ingerre adott válaszát korlátozza. A centrális nyúlványban a szinaptikus áttevődés modulációja lehet a K^+ áram változásának következménye. Egyes elméletek szerint egyébként a szómában vagy a periszomatikus régióban található K^+ csatornáknak is szerepük lehet az akciós potenciál terjedés szabályozásában. Az elképzelések szerint a szómában létrejövő kifejezett

hiperpolarizáció és ezzel együtt jelentkező konduktancia növekedés elégséges lehet a perifériás és centrális nyúlvány közötti akciós potenciál áttevődés gátlására, vagyis a periszomatikus K^+ konduktancia növekedés szűrő (filter) funkciót tölthet be az áthaladó akciós potenciálok tekintetében [133].

A K_{2P} csatornák szerepének vizsgálatára kiterjedten alkalmaznak különböző rágcsláló állatkísérletes modelleket, illetve azok különböző génihiányos változatait. Ezek gyakran rendkívül fontos betekintést engednek a csatornák fiziológias funkciójába, azonban elvileg előfordulhat, hogy a nyert eredmények nem feleltethetők meg tökéletesen az emberi élettannak. Ez az aggály a TRESK esetében nyomatékosan felmerül, mert meglepő módon az egér és humán orthológok szekvencia azonossága csak 67% [122]. (Az egyéb K_{2P} csatornáknál a hasonlóság magasabb, általában 80-90 %-os.) Ez a nagyfokú eltérés a szekvenciában természetesen megnyilvánul a humán és egér csatorna farmakológiájának és szabályozásának különbségeiben is, és óvatosságra int annak tekintetében, hogy túlzottan messzemenő emberre vonatkozó következtetéseket vonjunk le az egérben kapott eredmények alapján [123,134-136].

A TRESK csatorna heterológ expressziós rendszerben jellegzetes háttér K^+ áramot eredményez, aminek makroszkópos feszültség-áram összefüggése mérsékelt kifelé egyenirányítást (rektifikációt) mutat (5. ábra). Mint gyakorlatilag szinte minden K^+ csatorna, a TRESK is érzékeny csekély mértékben az extracelluláris pH változásaira (pH 7.5-ről 5.6-ra savanyítás kb. 20%-ban gátol). Ez a hatás messze elmarad pl. a TASK-1 csatorna érzékenységtől és nem valószínű, hogy élettani szabályozás alapja lenne. Az intracelluláris pH csökkenésre valamivel nagyobb válasz adódik (pH 7.5-ről 5.6-ra savanyítás kb. 60%-ban gátol). A TRESK áramot a hőmérséklet változása a 22-43 °C tartományban nem befolyásolja lényegesen (20%-nál kisebb hatás), tehát ebben a tulajdonságában a csatorna különbözik a TREK alcsalád tagjaitól. Szemben a TREK csatornákkal, a telítetlen zsírsavak (pl. arachidonsav) a TRESK-en gátlást okoznak, aminek az élettani jelentősége kérdéses, mert a hatás kifejtéséhez aránylag magas koncentrációjú arachidonsav szükséges (10 μ M kb. 75% gátlást eredményez) [121]. A TRESK mechanoszenzitivitását kevesen vizsgálták, patch clamp mérésekben a patch pipetta belső nyomásának változtatása nem okoz feltűnő áram ingadozást, szemben a TREK alcsalád esetében tapasztalhatóval. Egy munkacsoport kimutatótt enyhe mechanoszenzitivitást, azonban ezek az eredmények további megerősítésre várnak [137].

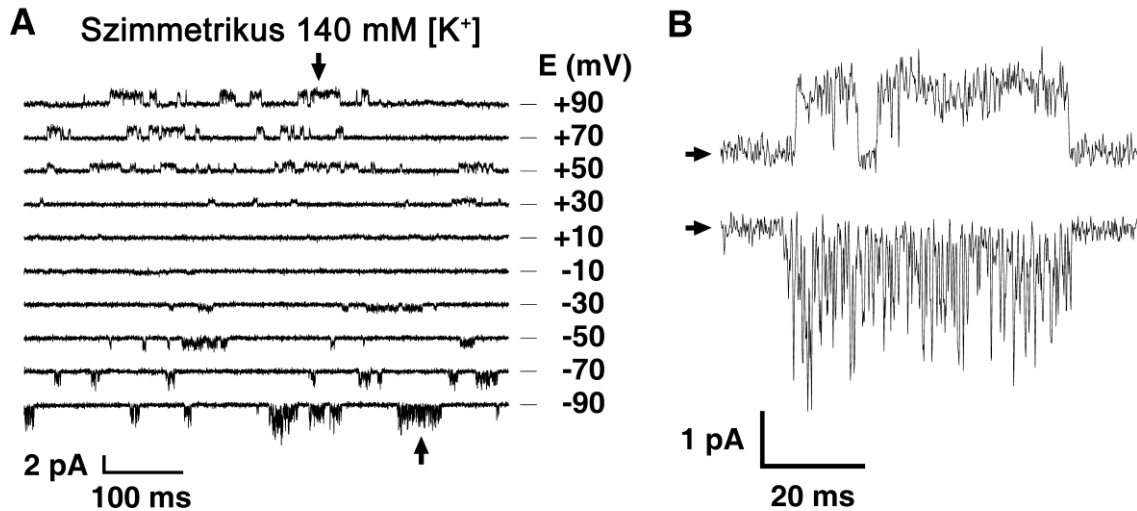


5. ábra: A humán TRESK feszültség-áram összefüggése.

A. TRESK cDNS-sel transzfektált L929 sejtekben kialakuló áramok -120mV -tól $+100\text{ mV}$ -ig terjedő feszültséglépések hatására. **B.** Feszültség-áram összefüggések különböző extracelluláris K^+ koncentrációjú oldatokban. (Átvéve a [121] közleményből. A pipettaoldat $149\text{ mM} [\text{K}^+]$ -ot tartalmazott.)

A $\text{K}_{2\text{P}}$ csatornák azonosításának egyik lehetséges módja az egyedi csatorna (single channel) tulajdonságok vizsgálata, amit sikeresen alkalmaztak a TRESK csatorna kimutatására a hátsó gyöki ganglion neuronokban [116]. A TRESK alapvető egyedi csatorna tulajdonságait munkacsoportunk közölte elsőként [122]. A TRESK egyedi csatorna árama jellegzetes, egyéb $\text{K}_{2\text{P}}$ csatornáktól eltérő, megkülönböztető jegyeket hordoz. A TRESK vezetőképessége 140 mM szimmetrikus $[\text{K}^+]$ esetén, $+60$ vagy $+90\text{ mV}$ -on körülbelül $12\text{-}14\text{ pS}$ [116,122]. Ezen a feszültségen a csatorna jól kivehető négyszögjelszerű megnyílásokat mutat, ahogy azt egy tipikus egyedi csatorna regisztrátumon megszoktuk. Ezzel szemben a negatív feszültségtartományban ugyanennek a csatornának a működése lényegesen eltérő. Szabályos négyszögjelszerű megnyílások nem oldhatók fel a szokásos teljesítményű patch clamp erősítővel, mert a csatorna csak nagyon rövid (gyakran $<1\text{ ms}$) megnyílások sorozatait produkálja. Felfogható ez gyorsan fellépő és megszűnő nyitott csatorna gátlásként (open channel block), vagy olyan komplex kapuzási mechanizmusként, amikor a rövid megnyílásokból álló kapuzási aktivitás fellángolásokban (burst) jelentkezik (6. ábra). E tekintetben meg kell maradnunk a fenomenológia szintjén, mert a jelenség mechanizmusa jelenleg nem

ismert. Mindenesetre az ilyen jellegű aktivitás megnehezíti az egyedi csatorna vezetőképesség becslését a negatív feszültségtartományban, ami körülbelül 16 pS-nek adódik [116,122]. Az ilyen mértékű aszimmetrikus egyedi csatorna viselkedés a K_{2P} családon belül a TRESK csatorna jellemző vonása.



6. ábra: A TRESK csatorna aszimmetrikus jellegű egyedi megnyílásai.

A. Az egér TRESK egyedi csatorna (single channel) megnyílásai láthatók a csatornát kifejező *Xenopus laevis* oocyta membránjából kivágott foltban (inside-out patch), a regisztrátumok mellett jobb oldalon jelölt különböző feszültségértékeken. **B.** Az ábra bal oldalán (az A paneleken) nyilakkal jelölt megnyílások nagyobb felbontással kiemelve. Jól megfigyelhetők a pozitív membránpotenciál értékeken jelentkező négyszögjelszerű események és a negatív értékeken jellemző rövid megnyílásokból álló kapuzás. (A pozitív potenciálokon mérhető áramok a sejtmembrán eredeti orientációját figyelembe véve, kifelé irányuló áramnak felelnek meg. Módosítva a [122] közleményből.)

3.2.2 Receptor mediált szabályozás

A G_q fehérje kapcsolt receptorok ingerlése eltérően hat a TRESK áramra, mint a korábban vizsgált TREK és TASK családba tartozó csatornák működésére. Míg a TREK és TASK csatornákat a receptor ingerlés – eltérő mechanizmussal (ld. fent) – gátolja, addig a TRESK áram többszörösére növekszik [122]. Az áram növekedés létrejön a csatornával koexpresszált M_1 muszkarinos acetilkolin receptor vagy angiotenzin receptor ingerlésének hatására, de emellett akkor is jelentkeznek, ha a csatornát kifejező *Xenopus* petesejt endogén lizofoszfátidsav (LPA) receptorait ingereljük. Ezek a szintén G_q kapcsolt receptorok tehát akkor is előidézik a TRESK áram 5-10-szeres fokozódását, ha

nem overexpresszált mennyiségben, hanem saját endogén expressziós szintjüknek megfelelően vannak jelen [122].

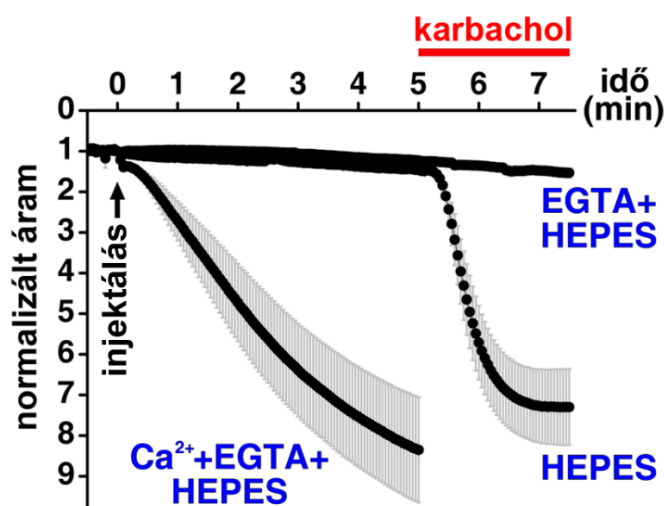
A receptor ingerlés hatására történő TRESK aktiváció jelenségét több laboratórium is függetlenül megerősítette [116,123,126,138,139]. Jellemző módon az aktiváció mértéke többszörös volt a *Xenopus* oocyta expressziós rendszerben, míg az emlős sejtvonal teljes sejt (whole cell) patch clamp mérésekben kisebbnek ($\approx 30\text{-}100\%$) adódott. A többszörös TRESK áram növekedés akkor volt kimutatható HEK-293 sejtekben, ha a mérőoldat alacsony extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -t tartalmazott és a pipettaoldatban nem volt ATP, ami a patch pipettából kidiffundálva a sejt purinerg receptorait ingerelhette a seal képzés előtt [140]. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a TRESK aktiváció kisebb mértékéért a teljes sejt patch clamp mérés körülményei felelősek, viszont az áram növekedése jól mérhető a *Xenopus* petesejt rendszerben, ahol a citoplazma összetétele a két elektródos feszültség clamp mérés közben lényegében változatlan.

A G_q fehérje kapcsolt receptor ingerlés TRESK aktiváló hatását kimutatták hátsó gyöki ganglion idegsejtekben is. Az acetilkolin, glutamát és hisztamin egyaránt fokozta a TRESK áram amplitúdót kis mértékben ($\approx 30\%$) [138]. A TRESK áramot aktiválta a hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion, DRG) neuronok endogén lizofoszfátidsav receptorainak ingerlése is, viszont ez az áram növekedés a TRESK génhiányos állatból izolált kontroll sejteken nem jött létre [132]. A lizofoszfátidsavval kiváltott TRESK aktiváció elegendően nagy mértékű volt ahhoz, hogy a DRG neuronok ingerlékenységét kimérhető módon gátolja; áramzár (current clamp) körülmények között az LPA-val kezelt sejtek csökkent akciós potenciál frekvenciával válaszoltak az ingerlő áramra. Érdekes módon a TRESK csatornára deficiens állatból izolált DRG neuronok ingerlékenysége kissé fokozódott LPA hatására, ami az agonista egyéb csatornákra kifejtett hatásával magyarázható.

A TRESK csatorna áramát a koexpresszált M_2 muszkarinos acetilkolin receptor ingerlése nem befolyásolta [122], ezért a G_i fehérje kapcsolt receptorok jelátviteli folyamatai valószínűleg nem vesznek részt ennek a csatornának a szabályozásában.

3.2.3 Kalcineurin foszfatáz – a TRESK szabályozás központi kulcs enzime

A TRESK nagyfokú aktivációját a citoplazma kalcium koncentráció növekedése váltja ki a G_q kapcsolt receptor ingerlés során [122]. A kalcium kelátor EGTA mikroinjektálása a csatornát kifejező *Xenopus* petesejtbe teljesen kivédte a TRESK receptor-függő aktivációját (7. ábra). A kalciummal telített EGTA mikroinjektálása hasonló mértékben aktiválta a TRESK áramot, mint az EGTA-val nem injektált (kontroll) sejtek karbachollal történő ingerlése. Ez jó összhangban van azzal a következtetéssel, hogy a citoplazma kalcium koncentráció megemelkedése a TRESK aktiváció szükséges és elégséges feltétele.



7. ábra: A TRESK csatorna receptor mediált aktivációja kalcium-függő folyamat.

Az ábrán a TRESK csatornát és M_1 muszkarinos acetilkolin receptort koexpresszáló *Xenopus* petesejtek normalizált és átlagolt K^+ áram görbéi láthatók. A sejtek három csoportját a mérés kezdetén három különböző oldattal mikroinjektálták (*injektálás, fekete nyíl*), ahogy ezt a kék feliratok mutatják (50 mM kalcium, EGTA és HEPES különböző kombinációi). A mérés végén az M_1 receptort karbachollal ingerelték (piros). A kontroll HEPES pH-puffer injektálása nem változtatta az áram nagyságát, majd a K^+ áram a várt módon aktiválódott karbachol hatására (*HEPES*). Ha az injektált oldat EGTA-t is tartalmazott, akkor az kivédte a karbachol aktiváló hatását (*EGTA+HEPES*). A kalciummal telített kelátor injektálása pedig önmagában, receptor ingerlés nélkül is aktiválta a TRESK áramot (*Ca²⁺+EGTA+HEPES*). (Módosítva [122].)

A TRESK aktivációja nemcsak a kalciummal telített kelátor mikroinjektálását követően jelentkezett, hanem kiváltható volt inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) mikroinjektálásával is, vagy a későbbiekben rutinszerűen alkalmazott kalcium ionofór ionomycin extracelluláris alkalmazásával. Mindezek az eredmények azt sugallták, hogy a TRESK egy Ca^{2+} -aktivált K_{2P} háttér K^+ csatorna. Ez óhatatlanul a klasszikus, régóta

ismert Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák (SK, IK és BK) analógiáját idézi fel [141], azonban ezek a csatornák meglehetősen eltérő szerkezetűek a TRESK-től, lényegében a 6TM/1P architektúrát követik és tetramerként funkcionálnak. A klasszikus Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák fehérjekomplexe közvetlenül köti a Ca^{2+} iont és ez vezet a csatorna megnyílásához. A TRESK csatornát azonban ettől eltérő módon szabályozza a kalcium.

A TRESK kalcium hatására megnövekedett árama a receptor agonista (vagy ionomycin) elvonását követően csak lassan, kb. fél óra alatt, tér vissza a kiindulási szintre. Ez a eredmény valószínűsítette, hogy a TRESK aktiváló hatást a kalcium közvetett úton hozza létre, hiszen a kalcium jel időtartama az adott körülmények között várhatóan jóval rövidebb, mint fél óra. Megerősítette ezt a következtetést, hogy a TRESK egyedi csatorna aktivitását egyáltalán nem befolyásolta a kalcium koncentráció megváltoztatása az intracelluláris oldalon, kivágott (excised, inside-out) membrán foltban [122]. Ez arra utalt, hogy a citoplazma jelentős szerepet játszik a TRESK aktiváció mechanizmusában, és a citoplazma eltávolítását követően a csatorna szabályozás nem jön létre a kivágott membrán foltban.

A TRESK kalcium-függő aktivációját teljesen kivédtek a ciklosporin A és FK506 (tacrolimus) kalcineurin gátlószerek, 100-200 nM-os koncentrációban. Ez azt sugallta, hogy ez a kalcium-kalmodulin-függő protein foszfatáz szerepet játszik a TRESK csatorna aktiválásában. A rekombináns, konstitutívan aktív kalcineurin koexpressziója a TRESK csatornával megnövelte a háttér K^+ áramot [122]. Így tehát bizonyossá vált, hogy a kalcineurin foszfatáz hatására létrejön a TRESK aktiváció [Ca^{2+}] növekedés hiányában is.

A kalcineurin TRESK szabályozásban betöltött szerepe felvetette azt a hipotézist, hogy a foszfatáz közvetlenül defoszforilálja a csatornát és ezáltal serkenti a csatornaféhrje kapuzását. Munkacsoportunk több mint egy évtizede végzett vizsgálatainak során ezt a hipotézist egyre több közvetett eredmény támasztotta alá, és értekezésemben további meggyőző közvetlen bizonyítékkal szolgálók arra vonatkozóan, hogy a TRESK csatornaféhrje kalcineurin hatására defoszforilálódik az élő sejtben. Az első megközelítés a kérdés vizsgálatára a TRESK csatorna szabályozásban potenciálisan szerepet játszó foszforilációs helyek azonosítása volt alanin-pásztázó mutagenézissel [122,142]. Ezek a vizsgálatok azonosították elsőként az intracelluláris hurok régióban a 262, 264 és 267 pozíciókban található szerin aminosavakat (a továbbiakban szerin

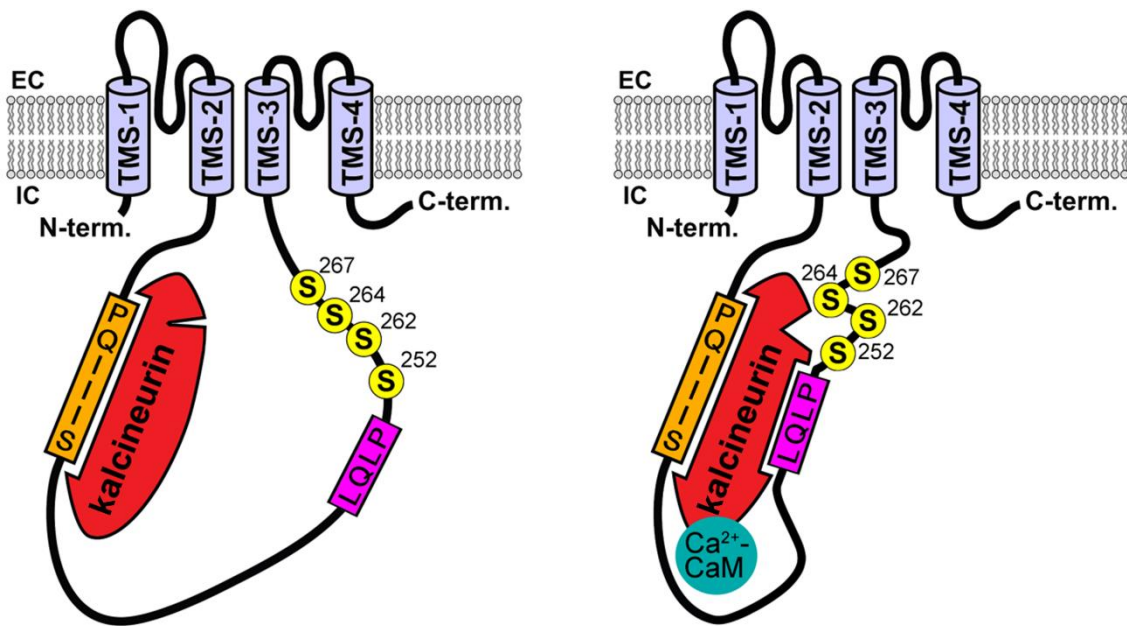
”klaszter”), mint a szabályozás várhatóan elsődleges célpontját, és emellett a 252-es pozíciójú szerint, mint járulékos hatású egyéb lehetséges regulátort. Ezeknek a szerinek az alaninra cserélése ugyanis megakadályozta a további aktivációt kalcium (ionomycin) hatására, és fokozta a csatornák bazális áramát, ahogy az várható volt abból a feltételezésből kiindulva, hogy az alanin a defoszforilált állapotot utánozza. (A dolgozatban kizárólag a humán csatornának megfelelő aminosav számozást használok.)

A kalcineurin foszfatáz közvetlenül, fehérje-fehérje interakcióval kapcsolódik a TRESK csatornához. A TRESK csatorna hurok régiójának kb. közepén található PQIIS szekvencia (jó közelítéssel) megfelel az elsőként NFAT transzkripció faktorban azonosított PxIxIT kalcineurin-kötő konszenzus motívumnak. Érdekes módon a TRESK PQIIS motívumának affinitása jóval nagyobb a kalcineurin iránt ($K_D \approx 5 \mu\text{M}$), mint a klasszikus szubsztrát NFAT PRIEIT szekvencia esetében ($K_D \approx 25 \mu\text{M}$) [143]. A kalcineurin a PQIIS motívumhoz közvetlenül kötődik, és a motívum mutációja csaknem teljesen kivédi a kalcium-függő TRESK aktivációt [144,145]. A megmaradó csekély hatásért egy második kalcineurin-kötő motívum felelős, az LQLP szekvencia, amely szintén a TRESK hurok régióban található, de közelebb a C-terminálishoz, a célpont szerinek szomszédságában (8. ábra, [145]). Ez a motívum az NFAT másodlagos kalcineurin-kötő LxVP konszenzus szekvenciájának felel meg hozzávetőlegesen. A rekombináns, *E.coli*-ban termeltetett TRESK hurok fehérje fent említett motívumai *in vitro* kötik a kalcineurin fehérjét [144,145] és a radioaktívan jelölt ATP jelenlétében foszforilált célpont szerineket a foszfatáz kalcium-függően defoszforilálja [145].

3.2.4 Kevésbé vizsgált szabályozási útvonalak

A TRESK kalcineurin-függő aktivációját követően az áram visszatérését a nyugalmi helyzetbe a csatornát gátló kinázok hozzák létre. Szintén ezek felelősek a TRESK bazális gátolt állapotáért. Ezek a kinázok azokat a TRESK szabályozásában fontos szerin aminosavakat foszforilálják, amelyeket a kalcineurin defoszforilál. A szabályozásban kiemelt fontosságú ”szerin klaszter” a mikrotubulus-affinitás-reguláló kináz (MARK) 1, 2 és 3 foszforilálja heterológ expressziós rendszerben [140]. (A MARK kinázok megfelelnek a PAR-1 “partition-defective” fehérjéknek [146].) Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint több mint húsz másik szerin-treonin kináz

típus nem tudta foszforilálni a "szerin klasztert". A MARK kináz gátolja a TRESK bazális áramát, ami megnyilvánul pl. abban, hogy az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ növekedés hatására létrejövő aktiváció kb. harmincszorosra fokozódik a kinázt és csatornát koexpresszáló sejtekben. Mindemellett, a MARK kinázok koexpressziója felgyorsítja a K^+ áram visszatérését a nyugalmi gátolt állapotba az ionomycin elvonását követően, hiszen gyorsítja a csatorna foszforilációját. [140]. Habár a MARK kísérletes körülmények között, heterológ expressziós rendszerben hatékonyan szabályozza a TRESK csatornát, jelenleg nem ismert, hogy élettani körülmények között ez a kináz vagy más még nem azonosított kinázok felelősek-e a "szerin klaszter" foszforilációjáért.



8. ábra: A TRESK csatorna interakciója a kalcineurinnal – sematikus modell.

A PQIIS hely (*narancs*) nyugalmi körülmények között is részlegesen telítve lehet kalcineurinnal (a citoplazma kalcineurin koncentrációjától függő mértékben), nagy affinitása miatt. Ha a citoplazma $[Ca^{2+}]$ megnő, akkor a kalcineurinhoz (*piros*) kötődik a kalcium-kalmodulin komplex (*türkiz*), és ennek hatására a kalcineurin hozzákapcsolódik a TRESK másik kalcineurin-kötő helyéhez, az LQLP motívumhoz (*magenta*). Emellett a kalcium-kalmodulin komplex kötődése fokozza a kalcineurin enzimaktivitását és a foszfatáz defoszforilálja a TRESK csatorna szabályozásban résztvevő szerin aminosavakat (*sárga*). (A TRESK transzmembrán régiókat a világoskék szín jelzi. Módosítva a [145] közleményből.)

A TRESK szabályozásában egészen pontosan még nem azonosított járulékos szerepet játszó S252 aminosavat *in vitro* foszforilálja a protein kináz A és feltételezhető, hogy ez a kináz az élő sejtben is szerepet játszik a S252 foszforilációjában [142,147]. A cAMP mikroinjektálása serkenti a szerin klaszter területén mutáns TRESK csatorna áramának visszatérését a nyugalmi állapotba, az ionomycinnel kiváltott aktivációt

követően, ami szintén a PKA TRESK szabályozásban betöltött szerepe mellett szól [142]. A S252 szerepe a csatorna aktivitás szabályozásában a fenti közvetett eredmények alapján valószínűsíthető, azonban ugyanez az aminosav ennél nyilvánvalóbb másik módon is fontos szerepet játszik a TRESK normális működésében.

A S252 része az RSN ζ CPE 14-3-3-kötő motívumnak (*aláhúзва* az aminosav szekvenciában) és egyben szabályozója az adapter fehérje foszforiláció függő kötődésének [147]. A homodimer szerkezetű 14-3-3 adapter fehérje ubikviter a sejtek citoplazmájában és több száz különböző partner fehérjéhez (vagy fehérjepárhoz) kötődik, azok aktivitását, lokalizációját és egyéb interakciós fehérjékkel való kölcsönhatását befolyásolja. Míg a kalcineurin-kötő motívumok elsősorban az emlős fajokban konzerváltak és a halakban, hüllőkben és madarakban észrevehetően hiányoznak a TRESK szekvenciából, addig a 14-3-3-kötő motívum a halaktól az emberig egyértelműen megtalálható [148]. Ennek megfelelően a kalcium-függő szabályozás az emlős TRESK sajátossága, pl. a humán és egér TRESK-re jellemző, de a zebrahal és csirke TRESK nem mutatja (saját és mások [123] mérései szerint). Az *E.coli*-ban termeltetett és *in vitro* PKA-val foszforilált egér TRESK hurok régió köti a rekombináns 14-3-3-at. Ugyanez a TRESK fragmentum csalifehérjeként használva "pull-down" interakciós vizsgálatban, kihalássza a 14-3-3 fehérjét (a kalcineurin mellett) egér agy citoszólból [142,144,145,147]. A kalcineurin és a 14-3-3 csíkok szembeötlő módon jelentkeznek SDS-PAGE gélen Coomassie festéssel. Habár az alacsonyabb rendű állatokban a TRESK 14-3-3-kötését tudtommal nem vizsgálták még közvetlenül, a nagyfokú szekvencia hasonlóság miatt szinte biztosra vehető, hogy ezek is hasonlóan kötik az adapter fehérjét, mint az egér csatorna. Ez viszont arra utal, hogy a 14-3-3-nak a kalcium-függő szabályozástól eltérő fontos funkciója is van, ami egyelőre nem ismert, talán a (dimer) csatorna szerkezet stabilizálásában vagy interakciós fehérjék (pl. kináz) kihorgonyzásában játszhat szerepet.

3.2.5 Élettani jelentőség

Azt követően, hogy a jelentős TRESK expressziót leírták a primer szenzoros neuronokban, számos vizsgálat célozta a csatorna élettani szerepének tisztázását és több

munkacsoport is elkészítette a TRESK génhiányos egér modellt a fenotípus vizsgálatára. Ezek a kísérletsorozatok azonban többnyire kis eltéréseket találtak a hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronok elektrofiziológiai tulajdonságaiban, és nem azonosítottak jellemző fenotípust. Az egyik tanulmány, amiben a vad típusú egeret a G339R funkcióvesztő mutációt hordozó génmódosított állattal hasonlították össze, arra a következtetésre jutott, hogy a TRESK a DRG szenzoros neuronok háttér K^+ áramának körülbelül 20%-áért felelős és a funkciójának kiiktatása nem befolyásolja a nyugalmi membránpotenciál értékét. Azonban az áramzár (current clamp) körülmények között meghatározott ingerlékenység fokozott volt – az akciós potenciál kiváltásához szükséges reobázis mintegy 60 %-kal csökkent – a TRESK csatornát nem tartalmazó sejtekben [125]. Mindemellett az akciós potenciál időtartamának megrövidülését tapasztalták, ami nem magyarázható a TRESK hiányával, hanem inkább az emiatt jelentkező egyéb kompenzatórikus csatorna expressziószint változásokkal. Egy másik tanulmány csekély eltérést talált a TRESK-deficiens egér egyik inhalációs anesztetikum iránti érzékenységében, 8 % növekedést az izoflurán minimális alveoláris koncentráció értékében, illetve ≈ 20 % csökkenést a forró (52-55 °C) lap teszt (hot plate test) latencia időben, ami enyhén fokozott fájdalomérzésre utal fájdalmasan forró ingerek esetén [149]. Emellett leírták, hogy az anesztetikumok tesztelését követően a TRESK hiányos egerekben a mortalitás mintegy 50 %-kal magasabb volt, mint a vad típusban, azonban ennek a jelenségnek az okára nem találtak magyarázatot.

Először egy humán genetikai vizsgálat vetette fel a TRESK kiemelt jelentőségét a trigeminális ganglion (TRG) neuronokban és a csatorna szerepét a migrénes fejfájás kialakulásában [126]. Olyan családot azonosítottak, amiben a TRESK egyik speciális kereteltolódásos mutációja (F139WfsX24) nyolc családtagban együtt öröklődött az aurával járó migrénnel, míg a mutációt nem hordozó másik nyolc családtag nem volt beteg. Nagy bizonytalanságot okozott azonban a kutatási területen, hogy később egy másik TRESK inaktiváló mutációról (C110R) kimutatták, hogy az heterozigóta formában nem okoz migrént emberben, holott heterológ rendszerben hasonló domináns negatív hatást fejt ki az ép TRESK alegységre, mint a kereteltolódásos mutáció [139,150].

A vad típusú TRESK overexpressziója a DRG vagy TRG neuronokban hiperpolarizáló hatású volt és csökkentette az idegsejtek ingerlékenységét kísérleti rendszerben [151,152]. A kereteltolódásos mutációt tartalmazó csatorna overexpressziója

fokozta az TRG neuronok ingerlékenységét [153], a C110R mutánsé viszont meglepő módon nem [150]. A közelmúltban egy tanulmány ezt a látszólagos ellentmondást azzal próbálta feloldani, hogy különbséget mutatott ki a kereteltolódásos és a C110R mutáns TRESK alegységek között abban, hogy milyen mértékben fejtenek ki domináns negatív hatást a TREK-1 és TREK-2 csatornákra [24]. A TREK csatornákra kifejtett gátló hatásért a kereteltolódás következtében fellépő alternatív transzláció iniciációval keletkező kóros TRESK fehérjedarabot tették felelőssé. Emiatt arra következtettek, hogy a primer szenzoros neuronok ingerlékenységének szabályozásában elsősorban a TREK csatornák jelentősek, és a TRESK mutáció csak ezek módosításával képes migrént előidézni.

Néhány hónapja két egymástól független közlemény jelent meg körülbelül egyidőben és ezek egyértelmű fenotípust rendeltek a TRESK csatorna hiányához egérben [154,155]. Az egyik tanulmány nem különítette el élesen a DRG és TRG neuronokat és számos funkcionális tesztet alkalmazott a DRG neuronok ellátási területének megfelelően. A legnagyobb különbséget a fültisztító pálcika (cotton swab) és a hát tapasz (back tape) tesztekben kapták, amelyekben a TRESK hiányos egér több mint kétszer gyakrabban húzta el a hátsó végtagját a szőrzet finom érintésére vagy próbálta meg eltávolítani a hátára tapasztott ragasztószalagot, mint a vad típusú állat [155]. Ezek az eredmények legvalószínűbben a szőrszálakat ellátó alacsony küszöbű mechanoreceptor (nem fájdalomérző) neuronok érzékenység fokozódásának tulajdoníthatók. Ez a munkacsoport emellett reprodukálta a korábbi eredményt [149], mivel 14%-kal rövidebb latenciaidőt mért forró lap (hot plate) tesztben a TRESK hiányos állatban, mint a vad típusúban, vagyis igazolni vélte a termikus ingerre válaszoló nociceptorok fokozott ingerlékenységét [155]. TRG neuronokon *in vitro* méréseket végeztek és itt óriási különbséget kaptak a vad típusú (WT) és TRESK génhányos (KO) egér között. A patch clamp mérés során 5 percig alkalmazott gyulladást szimuláló ingerre (50 nM bradikinin, 500 nM prosztaglandin E₂ (PGE₂), 2 μM ATP, 500 nM noradrenalin és 1 μM hisztamin) a KO egérből izolált TRG neuronok több mint 7-szer nagyobb számú akciós potenciált generáltak, mint a vad típusból nyert sejtek [155].

A másik tanulmányban élesen elkülönítették a TRG és DRG neuronokat és végkövetkeztetésül az adódott, hogy a TRESK hiánya szelektíven a nervus trigeminus ellátási területén nyilvánul meg, a DRG neuronok ellátási területén a különbség nem mérhető ki [154]. A viselkedési tesztek közül az OPAD (Orofacial Pain Assessment

Device) eszközzel találtak nagy különbséget a WT és KO egér között. A KO egér kevesebb, mint feleannyi alkalommal nyalta meg a sűrített tejért az 50 °C-ra melegített felületet, mint a WT, azonban a két csoportban a nyalások száma megegyezett, ha a felület hőmérsékletét 33 °C-ra állították. Hasonlóan jelentős különbség adódott a két csoport között, ha az egér arci régiójának bőrébe kapszaicint (az erős paprika hatóanyaga) injektáltak, vagy ha a bőrterületet acetonnal hűtötték. A KO egér mindkét esetben hosszabb ideig vagy többször törölgette az érintett területet, mint a WT. A feji területen nemcsak a fájdalmas termikus és kémiai ingerekre volt fokozott a KO egér érzékenysége, hanem hatalmas különbség adódott a mechanikai ingerek esetén is. A klasszikus von Frey filamentum módszernél az arci területen a KO egér 50%-os visszahúzási küszöb értéke (grammban mérve) kevesebb, mint harmada volt a WT egérének. Ezzel döbbenetes kontrasztot alkot, hogy a hátsó végtag területén hasonló módszerrel egyáltalán nem találtak különbséget a WT és KO állat között [154]. Ez a munkacsoport nem talált különbséget forró lap (hot plate) teszttel sem a két csoport között.

A fenti funkcionális teszteknek jól megfeleltek az elektrofiziológiai eredmények is. A TRG neuronok egyes csoportjainak ingerlékenységét fokozottnak találták, míg a DRG neuronok ingerlékenysége nem változott a KO állatból izolált primer szenzoros neuronokban a WT-hoz képest. A KO DRG sejtekből ugyan hiányzott a lamotrigin érzékeny háttér K^+ áram komponens (TRESK áram), azonban a teljes háttér K^+ áram abszolút nagysága nem különbözött a WT és KO között. Vagyis a DRG neuronok képesek voltak a TRESK hiányát másik csatorna típus fokozott expressziójával kompenzálni, szöges ellentétben a TRG neuronokkal, amelyekben a TRESK áram hiánya funkcionálisan megnyilvánult. Ezzel magyarázható a TRG neuronok patológiásan fokozott aktivitása a TRESK csatorna kiiktatása esetén, a DRG neuronok megtartott ingerlékenysége mellett [154]. A két tanulmány különböző TRG neuron szubpopulációt talált felelősnek a fájdalomérzésben talált különbségek létrehozásáért. Az egyik közlemény szerint a kis sejttesttel rendelkező izolektin B4 pozitív ($IB4^+$) neuronok ingerlékenysége nőtt döntően a TRESK hiányában, míg a másik közlemény szerint az izolektin B4 negatív ($IB4^-$) sejteké. Nyilvánvalóan további vizsgálatok szükségesek még, hogy a TRESK hiányában fellépő egyes funkcionális eltérések háttérben álló TRG neuron szubpopulációkat pontosan azonosítsák.

Tekintve az egér modellben leírt nagyfokú és több modalitásra is kiterjedő fájdalomérzés fokozódást a TRESK teljes hiányában, felmerül a lehetőség, hogy a TRESK áram csökkenésnek közvetlen szerepe lehet emberben is a migrén kialakulásában és a TRESK mutációk következménye nemcsak a TREK áramokra kifejtett domináns negatív hatáson keresztül érvényesül.

3.2.6 Farmakológiai tulajdonságok

A K_{2P} csatornák vizsgálatát nehezíti, hogy kevés specifikus gátlószerük ismert, annak ellenére, hogy a felfedezésük óta eltelt közel húsz évben jelentős erőfeszítések történtek gátlószerek keresésére/kifejlesztésére. A hátsó gyöki ganglion neuronban kifejeződő háttér K^+ csatornák közül a TREK-1 csatornára ható specifikus gátlószer ismert, a peptid természetű spadin [156,157], ami kísérletes körülmények között jól felhasználható. Emellett a vizsgálatok többségében kevésbé szelektív gátlószereket alkalmaztak a csatornák elkülönítésére. Munkacsoportunk több alkalommal sikeresen használta a ruténium vörös festéket a TASK-1 és TASK-3, illetve a TREK-1 és TREK-2 áramának megkülönböztetésére [10,158]. A ruténium vörös gátolja a TASK-3 és a TREK-2 csatornákat, de sokkal kevésbé a TASK-1 és TREK-1 áramot. A gátlás mindkét csatorna párnál egyetlen extracelluláris elhelyezkedésű aminosav különbözőségén alapul [158,159]. A ruténium vörös nem gátolja a TRESK csatornát sem, ezért felhasználható volt a TREK-2 és TRESK áramok arányának hozzávetőleges becslésére egyedi izolált hátsó gyöki ganglion neuronokban [158].

A TRESK csatorna gátlására számos kevésbé szelektív anyagot alkalmaztak sikerrel, mint pl. az antiepileptikum lamotrigin [138,151], a szecsuáni bors hatóanyag hidroxil- α -sanshool [160], illetve annak szintetikus származéka az izobutilalkenil-amid (IBA) [161], a rovarirtó pyrethroid vegyületek [162], vagy az arisztolsav (AristA) [163]. Munkacsoportunk írta le, hogy a TRESK áramot a Hg^{2+} mikromoláris koncentrációban gátolja, míg a többi K_{2P} csatornát nem befolyásolja, vagy aktiválja [135]. Ezek az anyagok azonban a TRESK-en kívül egyéb csatornák áramát is befolyásolják, ezért főként heterológ rendszerben használhatók, és a natív áramok elkülönítésére csak korlátozottan alkalmasak. Természetesen a fentiek mellett számos általános K^+ csatorna

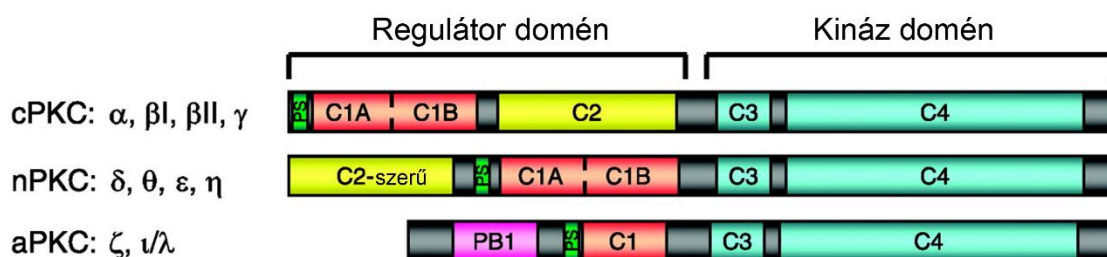
gátlószer fejt ki több-kevesebb hatást a TRESK csatornára, mint pl. a Ba^{2+} mM-os koncentrációban, quinine és quinidine [121], vagy a lokális érzéstelenítők (pl. benzokain [122]), azonban ezek ritkán használhatók fel megfelelő módon az elkülönítő vizsgálatokban.

A TRESK gátlók keresése fontos, hiszen ezekkel a farmakológiai eszközökkel közelebb juthatunk a csatorna szerepének megértéséhez. Terápiás szempontból azonban még ezeknél is érdekesebbek az aktiváló szerek. Ezek az anyagok a TRESK áram fokozásával hiperpolarizációt idéznek elő a szenzoros neuronokban és gátolhatják a (más okból létrejövő) patológiásan túlzott aktivitást. A TRESK csatorna áramát a K_{2P} családon belül különösen nagy mértékben serkentik az inhalációs anesztetikumok és ezek szenzoros rendszerben kifejtett hatásaihoz a TRESK aktivációja is hozzájárulhat [134]. Azonban az inhalációs anesztetikumok majdnem minden K_{2P} csatornát aktiválnak, tehát a hatásuk nem specifikus a TRESK-re. Vegyszer könyvtár szűrésével és tallium fluxus mérés módszer felhasználásával azonosították az antiámóbás hatású cloxyquin (5-chloroquinolin-8-ol) hatóanyagot, mint a TRESK aktiváló szerét [164]. A későbbiekben munkacsoportunk kimutatta, hogy a cloxyquin az egér K_{2P} csatornák közül specifikusan csak a TRESK-et aktiválja [165]. Érdekes módon a cloxyquin aktiváló hatása nagyban függ a TRESK csatorna funkcionális állapotától. Ha a csatorna defoszforilált, kalcineurin által már aktivált állapotban van, akkor a cloxyquin nem vagy nagyon csekély mértékben tudja csak tovább aktiválni a TRESK-et. Ezzel szemben a nyugalmi állapotú gátolt (foszforilált) TRESK csatorna áramát a cloxyquin többszörösére (*Xenopus* petesejtekben jellemzően kb. 4-szeresére) fokozza [165]. Kísérletes körülmények között a cloxyquin jól használható a TRESK áram növelésére és a foszforilációval összefüggésben álló aktiváló mechanizmusa a csatornaműködéssel kapcsolatos érdekes további kérdéseket vet fel. Azonban a hatóanyag alkalmazása élő állatban vagy terápiás céllal nem tűnik a gyakorlatban kivitelezhetőnek, tekintve a TRESK aktiváláshoz tartozó magas EC_{50} értéket (26 μM) és a valószínű nem specifikus hatásokat.

3.3 A TRESK és protein kináz C kapcsolatának előzményei

3.3.1 A protein kináz C enzimek csoportosítása és az "új típusú" (novel) izoformák helye az enzimes családon belül

A protein kináz C (PKC) a szerin-treonin kinázok AGC családjába tartozik, amely nevét a protein kináz A, G és C enzimekről kapta. A PKC C-terminális felén található a katalitikus kináz domén (9. ábra), ami az egész enzim családban konzervált, tartalmazza az ATP- és szubsztrát-kötő helyeket és a foszforiláció katalíziséért felelős. Több enzim izoforma aktivációjához szükséges a kináz doménben található "aktivációs hurok" régió foszforilációja, ami esetenként konstitutív, máskor szabályozó szerepet tölt be. A PKC N-terminális fele a regulátoros domén. Ez tartalmazza a pszeudoszubsztrát motívumot, ami a PKC szubsztrát szekvenciának felel meg, de a szerin/treonin foszfoakceptor hely helyett egy alanint tartalmaz. A pszeudoszubsztrát kötődése a katalitikus doménhez inaktív állapotban tartja az enzimet. A regulátoros domén egyik fontos szerepe, hogy szabályozza a pszeudoszubsztrát leválását a katalitikus doménről és ezzel az enzimaktivitást. Emellett szerepet játszik a PKC sejten belüli lokalizációjának változásában – gyakran az aktív enzim a plazmamembránhoz irányítódik, ahol membránfehérjéket foszforilál – és befolyásolja az enzim fehérje-fehérje interakcióit [166].



9. ábra: A protein kináz C izoformák doménszerkezete.

PS: pszeudoszubsztrát (*világoszöld*); **C1A és C1B:** DAG/PMA-kötő domén; **C2:** kalcium-függő anionos fosfolipid-kötő domén; **PB1:** protein-interakciós domén (Phox and Bem1). Az nPKC C2-szerű domén nem köt kalciumot, az aPKC C1 domén pedig nem köt DAG/PMA-t. (DAG: diacilglicerin; PMA: forbol-mirisztil-acetát). (Módosítva a [166] közleményből).

A PKC izoformákat három alcsoportba sorolják: a konvencionális (cPKC), az "új típusú" novel (nPKC) és az "atípusos" (aPKC) kategóriákba (az izoformákat görög betűkkel jelölik, beosztásukat ld. a 9. ábrán). A kategorizálás alapja a regulátoros domén szerkezete, illetve az ezeken alapuló funkcionális különbségek. A cPKC és nPKC

alcsaládok tagjai tartalmazzák a C1A és C1B doméneket, amelyek *in vivo* a megfelelő jelátviteli utak során keletkező diacilglicerin (DAG) felhalmozódásának PKC-t aktiváló hatásáért és az enzim plazmamembránhoz lokalizálásáért felelősek. A forbol-mirisztil-acetát (PMA) szintén a C1A és C1B doméneken keresztül aktiválja a cPKC és nPKC enzimeket, a fiziológiásan előfordulónál nagyobb mértékben (irreverzibilisen és valószínűleg természetellenesen kibővült szubsztrátspecificitással), ami számos falszpozitív hatás feltételezéséhez vezetett olyan tanulmányokban, amelyek kizárólag PMA-t használtak a PKC aktiválására. A cPKC izoformák emellett tartalmazzák a C2 domént, ami egy kalcium- és anionos foszfolipid-kötő helyet képez. A citoplazma $[Ca^{2+}]$ növekedéssel járó jelátviteli folyamatok a C2 doméneken keresztül a plazmamembrán belső felszínén található anionos foszfolipidekhez (pl. foszfátidil-szerin) kötik a cPKC-t alacsony affinitással, ami aztán a C1A és C1B domén közreműködésével erősebben is kihorgonyozódik, ha DAG is jelen van. Az nPKC enzimekben található C2-szerű doménből hiányoznak a Ca^{2+} -kötésért felelős negatív töltésű aminosavak, ezért a Ca^{2+} nem vesz részt ezeknek az izoformáknak az aktiválásában. Úgy gondolják, hogy az nPKC maximálisan aktiválódik a $[Ca^{2+}]$ -tól függetlenül olyan receptor agonisták hatására, amelyek jelentős DAG felszaporodást idéznek elő a plazmamembránban. Az aPKC enzimek nem aktiválódnak DAG vagy PMA hatására, C1 doménjük ezeket az ágenseket nem köti [166].

3.3.2 Korábbi adatok a PMA által TRESK csatornára kifejtett aktiváló hatásról

Ann-Kathrin Rahm és munkatársai Dierk Thomas heidelbergi munkacsoportjában leírták, hogy a humán TRESK csatornát a PMA (100 nM) lassan, körülbelül 30 perc alatt, jelentős mértékben (3.1 ± 0.2 -szeresre, $n=7$) aktiválja *Xenopus* petesejt heterológ expressziós rendszerben [136]. A hatást a PKC-ra specifikus gátlószerek, a Ro-32-0432 (3 μ M) és Bis I (1 μ M) részlegesen gátolták, ezzel igazolva, hogy a PMA ténylegesen a PKC közvetítésével növelte meg a TRESK csatorna áramát. A cPKC izoenzimekre specifikus aktivátor thymeleatoxin (TMX, 100 nM, 30 min) egyáltalán nem befolyásolta a TRESK áram nagyságát, ami kizárja a konvencionális izoformák szerepét a PKC által kifejtett TRESK aktivációban. A TRESK-et kifejező oocyták preinkubációja a specifikus kalcineurin inhibitor ciklosporin A-val (CsA, 1 μ M, 2-2.5h) és az ezt követő PMA+CsA

kombinált kezelés (30 min) ugyanakkora TRESK áram növekedést eredményezett, mint a PMA önmagában alkalmazva. Ebből az következik, hogy a PMA hatásában a calcineurin-függő TRESK aktiváció mechanizmusa nem vesz részt [136].

A TRESK intracelluláris hurok régiója nyolc feltételezett PKC foszforilációs konszenzus szekvenciát tartalmaz. Ezekben a foszfoakceptor aminosavakat egyesével alaninra cserélték in vitro irányított mutagenézissel (T161A, S162A, S178A, S184A, S205A, T216A, S224A és T239A) és a mutáns TRESK csatornák áramát vizsgálták [136]. Mindegyik csatorna jól kifejeződött *Xenopus* petesejtekben. Egyik mutáns csatorna PMA kezelés hatására létrejövő aktivációja sem különbözött szignifikánsan a vad típusú TRESK válaszáétól. Ez az eredmény erősen valószínűsíti, hogy a protein kináz C hatása nem a TRESK csatorna közvetlen foszforilációján keresztül jön létre.

Mivel a fenti adatok azt sugallták, hogy a PKC által létrehozott TRESK aktiváció a csatorna egy új, calcineurintól független szabályozási mechanizmusán alapul, megkezdjük a TRESK és a PKC interakciójának vizsgálatát farmakológiai és molekuláris biológiai eszközökkel.

4. Célkitűzések

1. Annak vizsgálata, hogy a forbol-mirisztil-acetát (PMA) hatása a TRESK csatornára milyen összefüggésben van a munkacsoportunk által korábban leírt kalcineurin-függő TRESK aktivációs mechanizmussal. A PMA tesztelése olyan mutáns TRESK csatornákon, amelyek szabályozása különböző okokból nem jöhet létre a kalcineurin útvonalon keresztül.
2. A PMA által létrehozott és kalcium-függő TRESK aktiváció együttes kiváltása. Létrejön-e szinergizmus a két hatás között, vagy a hatások egyszerűen additívak, vagy esetleg az egyik úton kiváltott aktiváció nem fokozható a másik úton tovább. A PMA hatásának összehasonlítása egér és humán TRESK csatornán.
3. Molekuláris biológiai eszközökkel szeretnénk volna megerősíteni, hogy a TRESK csatornát nemcsak farmakológia úton PMA-val lehet aktiválni, hanem ettől függetlenül is hat rá a protein kináz C. Olyan PKC izoenzim azonosítása, amelynek koexpressziója a csatornával TRESK aktivációt eredményez.
4. A PMA vagy PKC koexpresszió hatását kívántuk vizsgálni olyan körülmények között, amikor a csatorna foszforilációs státuszát a MARK2 kináz segítségével kísérletesen kontrolláljuk. Befolyásolja-e a PKC hatását, ha a TRESK csatornát a munkacsoportunk által korábban leírt módon a MARK kinázzal foszforiláljuk.
5. Célunk volt módszer beállítása a TRESK csatorna foszforilációs állapotának biokémiai vizsgálatára. Szerettük volna elsőként közvetlenül igazolni, hogy a teljes csatorna fehérjét a kalcineurin tényleg defoszforilálja az intakt, élő sejt membránjában. Vizsgálni kívántuk a PMA TRESK foszforilációra kifejtett hatását.
6. A fenti vizsgálatsorozattól függetlenül kíváncsiak voltunk, hogy a munkacsoportunk által közelmúltban kifejlesztett A2793 cloxyquin analóg hatása hogyan viszonyul a TRESK csatorna kalcium-függő aktivációjához.

5. Módszerek

5.1 Felhasznált vegyszerek

Vizsgálatainkhoz az analitikai tisztaságú vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Fluka (Milwaukee, WI, USA), Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) vagy Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) vállalatoktól vásároltuk. A molekuláris biológiai eljárásokhoz szükséges enzimeket és kitéket az Ambion (Austin, TX), Thermo Scientific (Waltham, MA), New England Biolabs (Beverly, MA) vagy Stratagene (La Jolla, CA) cégektől szereztük be. A forbol-12-mirisztil-13-acetát (PMA), 4 α -forbol-12-mirisztil-13-acetát (4 α -PMA) és 4 α -forbol-12,13-didecanoát (4 α -PDD) PKC aktivátorból vagy azok kontroll reagenseiből etanolban vagy DMSO-ban készítettünk 0.5 mM-os törzsoldatot. Az ionomycint (az ionofór kalcium sójával dolgoztunk) DMSO-ban oldottuk és 5 mM-os törzsoldatot készítettünk belőle. A fenti törzsoldatokat -20 °C-on tároltuk, majd közvetlenül a mérés előtt hígítottuk őket tovább a megfelelő mérő vagy oocyta inkubációs oldatban. A Phos-tag™ akrilamidot a NARD Institute, Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japán) vállalatától vásároltuk.

5.2 Plazmid konstrukciók és cRNS szintézis

A vad típusú és mutáns humán TRESK csatornák cDNS-ét tartalmazó *Xenopus* petesejt expressziós plazmidok laboratóriumunkban rendelkezésre álltak [122,140]. Az "új típusú" (novel) PKC izoenzimeket (ϵ és η) polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszoroztuk, Pfu polimeráz (Thermo Scientific) segítségével, reverz transzkripciót követően (RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific). A reakcióhoz a totál RNS-t TRIzol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA) tisztítottuk egér agyából. A PCR-hoz használt szensz és antiszensz oligonukleotidok szekvenciája a következő volt: 5' CAGGAATTCGCCGCCACCATGTCGTCCGGCACGATGAAGTTC 3' és 5' GCGCTCGAGCTTTGGTTCTGACTCCCCATAAG 3' a PKC η -nál és 5'

GCGCCTAAGGCCGCCACCATGGTAGTGTTC AATGGCCTTCTTAAG 3' és 5' GCGCTCGAGCTCCCTCCATCCGAAGCAGC 3' a PKC ϵ -nál. A PKC η cDNS-ét az EcoRI és XhoI restriktációs enzimek felhasználásával klónoztuk a pXEN *Xenopus* petesejt expressziós vektorba (GenBank EU267939.1), míg a PKC ϵ -t az Eco81I és XhoI enzimek segítségével. A PCR-hoz használt oligonukleotidok 5' végének szekvenciáját úgy terveztük, hogy azok tartalmazzák ezeket az egyedi restriktációs hasítási helyeket (ld. aláhúzva a szekvenciákban). A TRESK csatorna és PKC enzimek különböző mutáns változatait a QuikChange irányított mutagenézis kit (Stratagene) segítségével állítottuk elő a gyártó leírásának megfelelően. A mutációk előállításához használt primerpárok szekvenciáját a témavezetőm által kifejlesztett SeqHandler szoftverrel terveztük [144]. A mutáló primerek a kívánt mutáción kívül csendes (silent) mutációt is tartalmaztak, ami az aminosav szekvenciát nem változtatta meg, de új egyedi restriktációs hasítási helyet alakított ki a megváltoztatott DNS-ben, optimális esetben a kívánt mutációval átfedően. Minden DNS konstrukció kódoló régióját ellenőriztük automata szekvenálással.

Az egér MARK2 kettes izoformájának klónozását munkacsoportunk korábban közölte [140], a megfelelő kináz cDNS a pXEN vektorba klónozva munkám kezdetén rendelkezésre állt. A MARK2 Δ konstrukciót ebből alakítottuk ki úgy, hogy a kinázt a 361-es aminosavmaradéknál csonkoltuk. A csonkolt konstrukciót PCR segítségével készítettük el az 5' CGCGCAAGCTTTCAAAGGAGCAGATAGGTAGCC 3' antiszensz oligonukleotid felhasználásával, ami a pXEN vektorba klónozáshoz szükséges HindIII restriktációs helyet (*aláhúzva*) és egy újonnan beiktatott stop kondont (*duplán aláhúzva*) is tartalmazott.

A TRESK fehérje Western blot módszerrel történő hatékony kimutatásához dupla influenza hemagglutinin (HA) epitóp címkét építettünk be a csatorna N-terminálisába. A vad típusú humán TRESK MEVSGHP N-terminális szekvenciáját MEVSG-(YPYDVPDYA)-GG-(YPYDVPDYA)-GHP szekvenciára módosítottuk, ahol a két glicin aminosavval elválasztott két HA epitópot *zárójelek* között tüntettük fel. Az eredmények részben bemutatott kísérletekben a HA₂-N70Q-hTRESK konstrukciót alkalmaztuk, amiben a dupla HA epitópon kívül kialakítottuk az N70Q mutációt is, a csatorna N-glikozilációjának kivédésére [167]. Az N70Q mutáció nélkül a TRESK csatorna egy elnyújtott foltban ("smear") futott az SDS-PAGE gélen, azonban a mutáció jelenlétében megjelent a megfelelő csík az aminosavszekvencia alapján számolt

mérettartományban, mivel glikoziláció nélkül jelentősen csökkent a TRESK fehérje méretének heterogenitása.

A cRNS-eket az mMMESSAGE mMACHINE T7 Transcription kittel szintetizáltuk *in vitro* a gyártó előírásainak megfelelően (Ambion). A kódoló régiót tartalmazó pXEN templát plazmidot XbaI, SmaI vagy NotI enzimmal linearizáltuk a reakció előtt. A szintetizált cRNS így a plazmidba épített *Xenopus* globin mRNS 5' és 3' nem transzlált régiókat (UTR) is tartalmazta a kódoló szekvencia körül, a cRNS stabilitásának fokozására a petesejt citoplazmájában. A kész cRNS-t LiCl-dal precipitáltuk a gyártó leírásának megfelelően és a cRNS integritást formaldehides denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük etídium-bromid festéssel.

5.3 A *Xenopus* petesejtek preparálása és mikroinjektálása

Xenopus laevis (afrikai karmosbéka) felnőtt egyedekből ovárium lebenyeket távolítottunk el. A szövetet OR2 oldatban kollagenázzal emésztettük 18 °C-on 20-30 percig óvatos forgatás mellett, majd további 10 percig friss emésztő oldatban erőteljesebb mechanikai hatást biztosítva. A hipotóniás, nominálisan Ca²⁺-mentes OR2 oldat mM-ban a következő összetevőket tartalmazta: NaCl 82.5, KCl 2, MgCl₂ 1, HEPES 5 (pH 7.5, NaOH). Az emésztést 1-es típusú kollagenázzal (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) végeztük 1-2 mg/ml koncentrációban. A kollagenázt többszöri öblítéssel (OR2) alaposan eltávolítottuk a Ca²⁺ visszaadása előtt. Az emésztést követően a folliculáris réteget mechanikai úton finom csipeszekkel távolítottuk el a petesejtek felszínéről. A vitellin membrán érintetlen maradt.

A körülbelül 0.9-1.2 mm átmérőjű, többnyire V. és VI. érési stádiumnak megfelelő petesejteket ezt követően finom billegtetés mellett 18 °C-on inkubáltuk módosított Barth's oldatban, amelynek összetétele mM-ban a következő volt: NaCl 88, KCl 1, NaHCO₃ 2.4, MgSO₄ 0.82, Ca(NO₃)₂ 0.33, CaCl₂ 0.41, HEPES 20 (pH 7.5, NaOH), Na-piruvát 4.5, teofillin 0.5, kiegészítve penicillinnel (100 U/ml) és streptomycinnel (100 µg/ml). A sejteket a defollikulálást követő napon mikroinjektáltuk 50 nl cRNS oldattal (Nanoliter Injector, World Precision Instruments, Sarasota, FL). A cRNS oldat esetenként többféle cRNS keverékét tartalmazta. Jellemzően 0.3-2.5 ng cRNS-t injektáltunk oocytánként a megfelelő expressziós szintek elérésére, a HA₂-N70Q-

hTRESK konstrukció kivételével, amiből mintegy tízszer nagyobb mennyiségű cRNS-re volt szükség a glikoziláció-mentes csatorna elégséges kifejeződéséhez. Az elektrofiziológiai méréseket a mikroinjektálást követő harmadik napon végeztük.

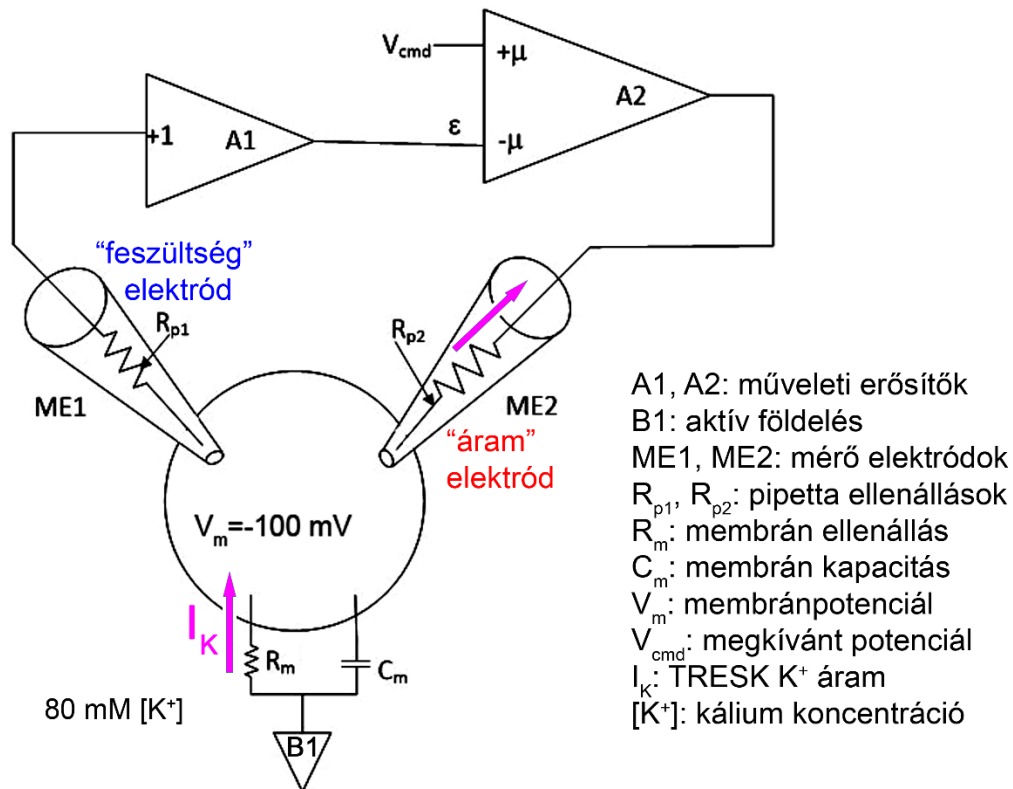
A *Xenopus laevis* békákat a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Központ állatházában szakképzett személyzet gondozta. Az állatokat a szokásos módon, szűrt és folyamatosan cserélődő vizű 50 L-es tartályokban tartottuk 19 °C-os légkondicionált helyiségekben. Az állati szövetekkel végzett kísérleteket a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi és Etikai Bizottsága jóváhagyta (XIV-I-001/2154-4/2012) és a kísérleteket az állatvédelemre vonatkozó intézményi és törvényi szabályozást betartva hajtottuk végre.

5.4 Két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) mérés

A TRESK áramot két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) módszerrel (10. ábra) mértük *Xenopus* petesejtekben OC-725C erősítő alkalmazásával (Warner Instrument Corp., Hamden, CT). Az elektrofiziológiai méréseinkből származó adatokat Digidata Interface 1200 vagy 1440A (Axon Instruments, Foster City, CA) AD/DA konverter segítségével digitalizáltuk és a pClamp 6.0.2 vagy 10.1 szoftvercsomag (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) komponenseivel regisztráltuk. Az adatok kiértékelésére a szoftvercsomag Clampfit programját használtuk. Az alacsony K^+ koncentrációjú extracelluláris oldat mM-ban kifejezve a következőket tartalmazta: NaCl 95.4, KCl 2, $CaCl_2$ 1.8, HEPES 5 (pH 7.5, NaOH). A magas, 80 mM K^+ koncentrációjú oldatban a $[Na^+]$ -t megfelelően csökkentettük úgy, hogy a két oldatban a $[K^+]$ és $[Na^+]$ összege állandó maradjon. Az extracelluláris oldattal a mérőkamrát folyamatosan átáramoltattuk a mért petesejt körül egyszerű gravitációs módon működő perfúziós rendszerrel.

A két intracelluláris mikroelektrodot boroszilikát üvegből (BF120-94-10, Sutter Instruments) készítettük P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA) pipettahúzó berendezésben. A mikroelektrodokat 3 M-os KCl-dal töltöttük fel, így az ellenállásuk a 0.3-1 M Ω tartományba esett, a bennük található oldatot Ag/AgCl elektródon keresztül kapcsoltuk a mérőberendezéshez. A TRESK áramot -100 mV-on a magas $[K^+]$ -jú oldatban mértük egy 4 másodpercenként ismétlődő, 300 ms hosszú

feszültséglépés végén. Az így kapott áramból levontuk az azonos körülmények között de alacsony $[K^+]$ -jú oldatban mért áram nagyságát. A kísérleteket szobahőmérsékleten (21 °C) végeztük. Ilyen mérési körülmények között a nem injektált vagy desztillált vízzel injektált *Xenopus* petesejtek endogén K^+ árama jellemzően 50 és 200 nA közöttinek adódott. A TRESK konstrukciók kifejezése során legalább egy nagyságrenddel nagyobb amplitúdójú áramokat vizsgáltunk, amelyekhez az endogén áram komponens hozzájárulása jó közelítéssel elhanyagolható volt.



10. ábra: A két elektródos feszültségzár (voltage clamp) mérés sematikus kapcsolási rajza.

A Molecular Devices cég ábrája módosítva.

(<https://www.moleculardevices.com/applications/patch-clamp-electrophysiology/what-two-electrode-voltage-clamp-tevc-method>)

5.5 A TRESK csatorna foszforilációs állapotának vizsgálata Phos-tag™ SDS-PAGE és anti-HA immunoblot módszerrel

A HA₂-N70Q-hTRESK konstrukciót kifejező *Xenopus* petesejtekből a cRNS mikroinjektálását követő harmadik napon plazmamembrán preparátumot készítettünk. Az oocytákat (10-30 db csoportonként) 1 ml jéghideg lízis oldattal homogenizáltuk 20 húzással üveg Potter homogenizálóban jégen. A lízis oldat összetétele mM-ban megadva:

HEPES 20, imidazol 40, NaF 40, EDTA 10, Na-ortovanadát 1, fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF) 1, benzamidin 1, amit kiegészítettünk a következőkkel: leupeptin (5 mg/ml), foszfátáz inhibitor koktél 1 (1%, P2850; Sigma, St. Louis, MO). Az oldat pH-ját 7.9-re állítottuk NaOH hozzáadásával. A homogenizátumot centrifugáltuk 1000 g-vel 10 percig 4 °C-on, majd a felülúszót – a tetején lévő lipid réteg kivételével – újra még egyszer centrifugáltuk ugyanígy 1000 g-vel 10 percig. A második centrifugálás utáni, szikanyag szemcséktől, melanoszómáktól, sejtmagtól és egyéb nagyobb méretű törmeléktől mentesített felülúszót 16000 g-vel centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on, majd a plazmamembrán darabokban bedúsult pelletet feloldottuk 40-80 µl tömény SDS-mintapufferben (TrisCl 0.31 M pH 6.8, SDS 10%, glicerin 50%, merkaptotanol 25%, és brómfenol kék 0.2%). A plazmamembrán preparátumot azonnal felhasználtuk vagy -80 °C-on tároltuk. Plazmamembrán preparálási módszerünk kis módosításoktól eltekintve megfelelt az általánosan bevált eljárásnak [168,169].

Kísérleteinkben a HA₂-N70Q-hTRESK cRNS-sel injektált petesejtekből több egyenlő számú csoportot képeztünk és ezeket a plazmamembrán preparálás előtt különböző módon kezeltük. A PMA hatását a TRESK csatorna foszforilációra úgy vizsgáltuk, hogy a sejteket 45 percig PMA-val (100 nM) kezeltük, a ciklosporin A (CsA, 1 µM) és FK506 (tacrolimus, 1 µM) kalcineurin gátlók jelenlétében. A hatóanyagokat az alacsony (2 mM) K⁺ koncentrációjú mérőoldatban hígítottuk, ld. az előző Módszerek 5.4 alfejezetben). A negatív kontroll sejteket, amelyekben várakozásunknak megfelelően a TRESK csatorna foszforilációja fenntartott, ugyanígy kezeltük kalcineurin gátlószerekkel, de PMA hozzáadása nélkül. Emellett kétféle pozitív kontrollt is alkalmaztunk. Az egyik esetben ugyanígy kezeltük a sejteket (CsA+FK506) mint a negatív kontroll esetben, de az ezekből származó membránpreparátumot *in vitro* defoszforiláltuk λ foszfátázzal (Santa Cruz, sc-200312A). Ennél a csoportnál a membránpreparátumot nem SDS-mintapufferben vettük fel, hanem 20 µl Mn²⁺ tartalmú defoszforiláló puffert adtunk hozzá, amelynek összetétele mM-ban megadva a következő volt: HEPES 50 (pH7.5, NaOH), EGTA 1.5, DL-dithiothreitol 7.5, MnCl₂ 3. Ebben a közegben a fehérjéket 2 µl λ foszfátázzal (400 U/µL) defoszforiláltuk egy óráig, majd a mintát ezután vettük fel SDS-mintapufferben. Az *in vitro* defoszforilált preparátum mellett, egy olyan pozitív kontroll csoportot is vizsgáltunk, amiben a defoszforilációt *in vivo* hoztuk létre. Ebben a csoportban 3 percig ionomycinnel (1 µM) kezeltük a

petesejteket a homogenizálás előtt, kalcineurin gátlók nélkül. Elektrofiziológiai méréseinkből tudjuk, hogy az ionomycin ilyen körülmények között erőteljes TRESK aktivációt okoz kalcineurinon keresztül, vagyis ebben a csoportban is a TRESK fehérje defoszforilációja volt jósolható.

A különböző előkezeléseken átment petesejt csoportokból származó membrán preparátumokban az eltérően foszforilált TRESK fehérjéket a Phos-tag™ SDS-PAGE módszerrel választottuk szét. A Zn²⁺-Phos-tag módszert használtuk 8%-os poliakrilamid gélekkel és a neutrális (Tris-MOPS) pufferrendszert a gyártó útmutatásának megfelelően (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). A Phos-tag koncentráció 15 µM volt a kísérletekben és ennél háromszor nagyobb moláris koncentrációban öntöttük bele a gélek anyagába a ZnCl₂-ot. A csíktömörítő (stacking) és elválasztó (separating) gélekbe is tettünk kis mennyiségű (0.1%) SDS-t. A mintákhoz (5-10 µl az SDS-mintapufferben felvett membránpreparátumból) a felvitel előtt ZnCl₂-ot és NaOH-ot adtunk: 5 µl mintához 1 µl 25 mM-os ZnCl₂-ot az EDTA telítésére és 1 µl 40 mM-os NaOH-ot az alkalikus pH helyreállítására. Erre amiatt kényszerültünk, mert a szabad EDTA nem kompatibilis a Phos-tag szétválasztási módszerrel, az EDTA Zn²⁺-kel telítése közben viszont a minta SDS-PAGE módszerrel összeegyeztethetetlen savanyodása alakul ki. Ezt követően a Phos-tag SDS-PAGE gélen az elektroforézist 50 V-on folytattuk, amíg a minták mellett felvitt színes markerprotein csíkok az empirikusan meghatározott kedvező pozícióba nem vándoroltak. (A Phos-tag gélen a vándorlási sebesség nem kizárólag a molekulatömeg függvénye.)

A Phos-tag gélen szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Schleicher and Schuell, Keene, NH) blottoltuk. A blottolás előtt, hogy a Zn²⁺-et minél jobban eltávolítsuk, a gélt alaposan mostuk metanol-mentes Towbin transzfer pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, pH 8.6 ± 0.2). Az első hat mosás során (20 ml 10 percig minden esetben) a mosóoldatot kiegészítettük 10 mM EDTA-val. A hetedik mosás EDTA-mentes volt. A fehérjék átblottolását a membránra 20 % metanolt és 0.05 % SDS-t tartalmazó Towbin pufferben végeztük nedves/tartály módszerrel (wet/tank blotting), 50 V-on egy éjszakán keresztül, külső jeges hűtés mellett, hidegszobában.

A membrán nem specifikus kötőhelyeit blokkoltuk 0.2 g/10 ml szarvasmarha szérum albumin, 0.5 g/10 ml zsírmentes tejpor és 0.2 % Tween-20 detergens keverékével, amit PBS-ben (phosphate-buffered saline, 100 ml-ben tartalmaz: 0.85 g NaCl, 0.56 g

Na_2HPO_4 , 0.02 g NaH_2PO_4 , pH 7.4 (HCl vagy NaOH)) oldva adtuk a membránhoz (blokkoló puffer). A membránt két órán át billegtettük lassan szobahőn az elsődleges antitest jelenlétében. Elsődleges antitestként egér monoklonális anti-HA IgG1-et használtunk (26183, Clone 2-2.2.14, Thermo Scientific), amit 10000-szeresre hígítottunk 10 % blottoló pufferrel kiegészített PBS-ben. A másodlagos antitest tormaperoxidázzal (HRP, horseradish peroxidase) konjugált, kecske eredetű anti-egér IgG volt (R-05071-500; Advansta, Menlo Park, CA), amit hasonló körülmények között alkalmaztunk, mint az elsődleges antitestet, azonban csak egy óráig. A membránt egyszer mostuk a blokkolást követően, és 4-6 alkalommal 5-10 percig az egyes antitesteket követően 20-30 ml PBS-sel, ami 0.1% Tween-20-at is tartalmazott. A csíkokat fokozott kemilumineszcencia módszerrel detektáltuk a gyártó leírásának megfelelően (WesternBright ECL HRP, Advansta).

5.6 Adatok kiértékelése és statisztikai analízis

Az adatok átlag \pm az átlag hibája (standard error of the mean, S.E.M) formában kerültek megadásra és ábrázolásra. Minden tesztnél $p < 0.05$ esetén tekintettük a különbség(ek)et szignifikánsnak, azonban tájékoztató jelleggel a p érték kisebb felső korlátját adtuk meg a szövegben, ha volt ilyen. Az ábrákon az alacsonyabb p értéket a csillagok számának növelésével érzékeltettük. A különbségek kiértékelésére használt teszt típusát a kísérleti modellnek megfelelően állapítottuk meg, az eredményül adódó adatok jellegét is figyelembe véve előre meghatározott algoritmus segítségével. Az adatok normál eloszlását a Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk, a variancia homogenitást pedig a Levene teszttel. Ha a Shapiro-Wilk teszt szignifikáns volt bármelyik csoportban, akkor a nem paraméteres Mann-Whitney U tesztet használtuk. Ha a Levene teszt adott szignifikáns eredményt, akkor a heteroszkedasztikus (Welch-Satterthwaite korrigált) t-tesztet használtuk két független csoport esetén, vagy a Welch variancia analízist (ANOVA) és a Games-Howell post hoc tesztet több csoport összehasonlítására. A normál eloszlású és homoszkedasztikus esetekben az összehasonlítások számának megfelelően Student t-tesztet vagy egyutas (Fisher) ANOVA-t és ezt követően Tukey HSD post hoc tesztet alkalmaztunk. Emellett egy esetben páros Wilcoxon próbát (matched-pairs test), egy másik esetben pedig MANOVA (multivariate analysis of variance) tesztet

használtunk ahogy ezt a kísérleti modell megkívánta. A statisztikai számításokat a Statistica 13.4 (TIBCO Software, Tulsa, OK) vagy SPSS Statistics 25.0 (IBM Corporation) szoftverekkel végeztük. A denzitometriás adatokat Wayne Rasband (Research Services Branch, NIH, Bethesda, MD) ImageJ 1.47v szoftverével analizáltuk.

6. Eredmények

6.1 A TRESK szerin 264 aminosav mutációi kivédik a PMA csatorna aktiváló hatását

A PMA által kifejtett TRESK áram aktiváció reprodukálható volt laboratóriumunk mérési körülményei között [136]. A PMA minden vizsgált *Xenopus* petesejt preparátumban jelentős mértékben növelte a humán TRESK K⁺ áramot, azonban a relatív aktiváció mértéke sejtpreparátumonként eltérőnek adódott. Az értekezésben bemutatott kísérletekben az áram növekedése, átlagát tekintve jellemzően kétszeres és több mint hatszoros között változott. A sejtpreparátumok közötti jelentős különbség megnehezítette a több független kísérletből meghatározott adatok kiértékelését, ezért a legtöbb mérésünkben egy preparátumból származó petesejt csoportokat hasonlítottunk össze.

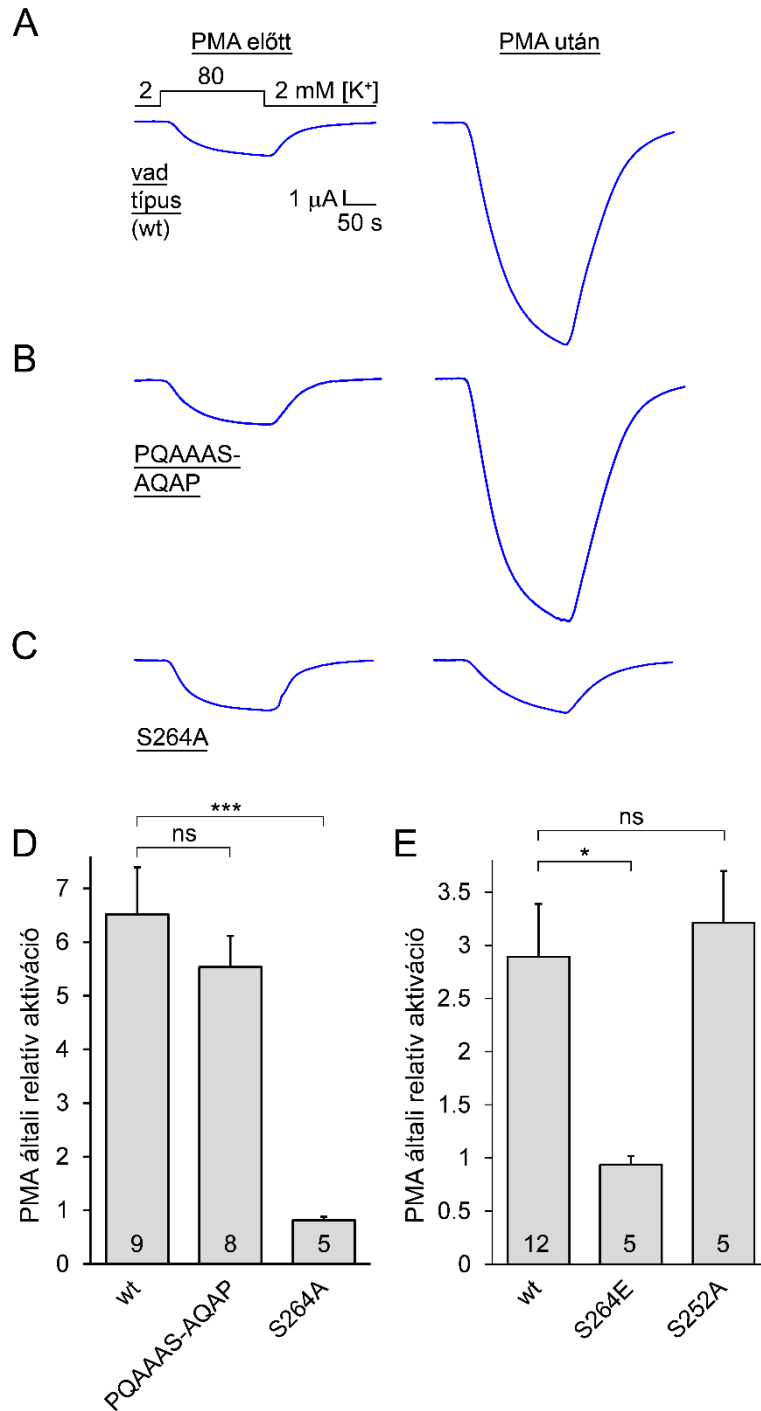
Első vizsgálatsorozatunk azt a kérdést célozta, hogy milyen összefüggés van a PMA által elindított és a kalcineurin-függő TRESK aktivációs mechanizmusok között. Ezért olyan mutáns csatornákon vizsgáltuk a PMA hatását, amelyek kalcineurin-függő aktivációja különböző okokból deficiens volt. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a mindkét kalcineurin-kötő helyén mutáns humán TRESK csatorna egyáltalán nem aktiválódik a citoplazma [Ca²⁺] növekedés hatására [145]. Ezen a TRESK-PQAAAS-AQAP konstrukción teszteltük a PMA hatását, amiben a PQIIS és LQLP kalcineurin-kötő szekvenciákat alanin cserékkel funkcióképtelenné tettük. Kontrollként a vad típusú TRESK csatornát használtuk.

A PMA adása után kialakuló, körülbelül fél óráig tartó lassú csatorna aktiváció folyamatos követése minden egyes sejtben két-elektrodos feszültségzár méréssel erősen korlátozta volna módszerünk átocsátó képességét, ezért más mérési protokollt dolgoztunk ki. Minden petesejtet két alkalommal mértünk és a két mérés között eltávolítottuk a mérőkamrából, illetve ezidő alatt történt a forbol-észter kezelés. Egy ilyen tipikus mérés eredménye látható vad típusú TRESK csatornát kifejező petesejtből a 11. ábra A panel regisztrátumain. Ebben a kísérletben az első és a második mérés során is a TRESK áram nagyságát határoztuk meg -100 mV-on extracelluláris oldatsere segítségével, amikor a töltéshordozó koncentrációját 2 és 80 mM között változtattuk. A

két mérés között a sejteket 42-46 percig PMA-val (100 nM) kezeltük. A bal felső panelen (11. ábra A) látható a reprezentatív nyugalmi TRESK áram, míg mellette jobb oldalon a PMA kezelést követően mérhető jelentős áram növekedés.

Ha ugyanezt a mérést a TRESK-PQAAAS-AQAP csatornát kifejező petesejten végeztük el, akkor hasonló áram növekedést kaptunk, mint a vad típusú csatornát expresszáló sejtnél (11. ábra B). A vad típusú csatornát kifejező sejtekben az aktiváció átlagosan 6.5 ± 0.9 -szeres volt ($n=9$), míg a calcineurin-kötőhely mutáns TRESK-et kifejező csoportban 5.5 ± 0.6 -szorosnak adódott ($n=8$, 11. ábra D, bal oldali két oszlop). A különbség nem volt szignifikáns. Ez arra utal, hogy a calcineurin-függő aktivációs mechanizmus kiiktatása nem védi ki a PMA hatását, tehát a protein kináz C nem a calcineurin közreműködésével aktiválja a TRESK csatornát.

Ugyanezt a kísérletet elvégeztük olyan mutáns TRESK csatornával is, amiben a "szerin klaszter" területén a 264-es szerin aminosavat alaninra cseréltük. Ez a csatorna konstitutív aktivitást mutat, mivel a defoszforilált állapotot utánozza az egyik legfontosabb szabályozási ponton. A magas bazális aktivitásnak megfelelően az S264A mutáns calcineurinon keresztül nem (vagy csak nagyon kis mértékben) aktiválható tovább. A TRESK S264A mutáns árama PMA hatására egyáltalán nem növekedett (ld. a 11. ábra C panelen a reprezentatív regisztrátumokat és az D panelen a harmadik oszlopot). Az áram 0.82 ± 0.07 -szeresére változott ($n=5$), vagyis átlagban körülbelül 20 %-kal csökkent. Nem vizsgáltuk, hogy ez a csökkenés szignifikáns volt-e és azt sem, hogy mi lehet az oka. Viszont az egyértelmű, hogy az S264A mutáns PMA által kifejtett aktivációjának mértéke elmarad a vad típusú TRESK csatornától ($p < 0.0005$). (Ebben a kísérletben az S264A mutáns TRESK csatorna cRNS-éből kisebb mennyiséget mikroinjektáltunk, mint a vad típusú csatornáéból. Ezzel elkerültük, hogy a petesejtekben toxikus nagyságú nyugalmi háttér K^+ áram expresszálódjon és a két csoportban hasonló nagyságú bazális áramokat is kaptunk. A bazális áram nagysága az S264A csoportban erősen szórt az 1.3-7.2 μA tartományban, azonban a PMA egyik sejtben sem növelte a háttér K^+ áram nagyságát.)



11. ábra: A PMA által kiváltott humán TRESK aktivációt kivédik az S264A és S264E mutációk, de a PQAAS-AQAP és S252A mutációk nem befolyásolják.

Reprezentatív regisztrátumok láthatók a vad típusú (A), PQAAS-AQAP mutáns (B) vagy S264A mutáns (C) TRESK csatornát kifejező petesejtekből. Bal oldalon a nyugalmi, jobb oldalon pedig a 42-46 perces PMA (100 nM) kezelést követően mért áramokat láthatjuk. A bal felső regisztrátum fölött az EC $[K^+]_o$ változtatásait jelöltem. A mérési protokoll és a regisztrátum alatti lépték mind a hat reprezentatív mérésre érvényes. Az áramokat -100 mV-on mértük. **D.** Az A-C paneleken bemutatott kísérlet eredményeiből kiszámítottuk a PMA által létrehozott

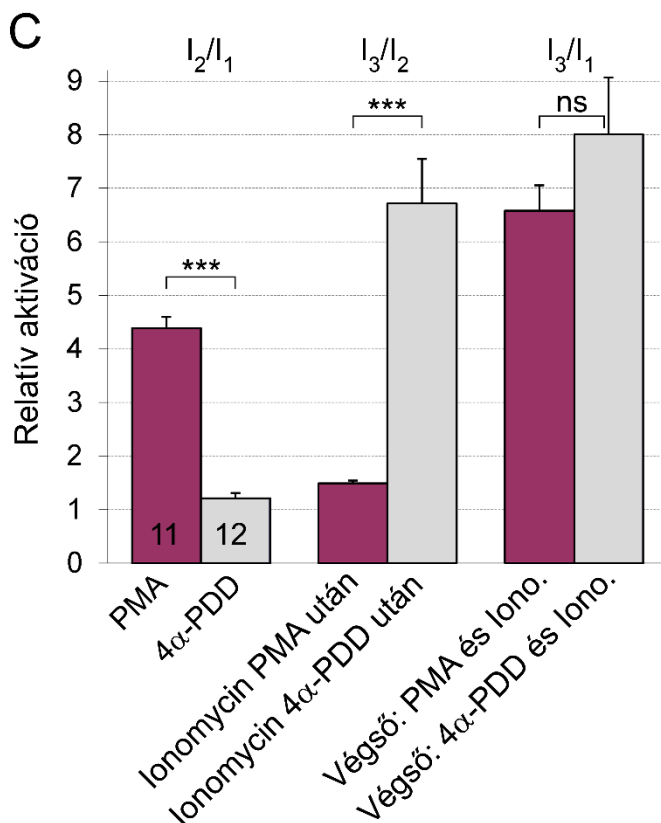
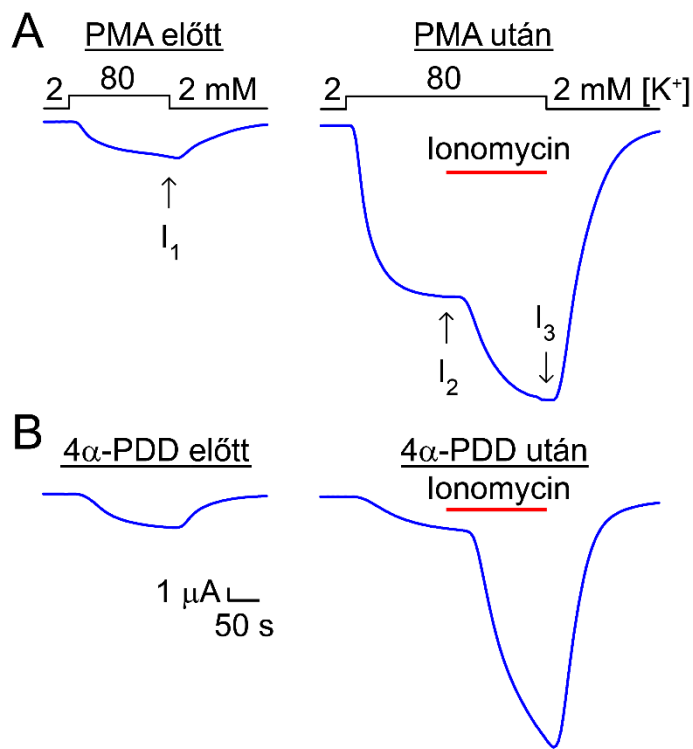
normalizált aktiváció mértékét, amit az első mérésben meghatározott áram nagyságra vonatkoztattunk. Az elemszámokat az oszlopokban tüntettük fel. **E.** Egy másik oocyta preparátumban összehasonlítottuk a vad típusú, S264E, illetve S252A mutáns csatornák PMA hatására létrejövő aktivációját. Az S264E mutáció teljesen kivédte, míg az S252A mutáció nem befolyásolta a PMA hatását. (Ebben a sejtpreparátumban a PMA a vad típusú TRESK kisebb relatív aktivációját okozta, mint az D paneleken bemutatott kísérletben.) * $p < 0.01$; *** $P < 0.0005$; Welch ANOVA majd Games-Howell teszt; ns: nem szignifikáns; wt: vad típus.

Látva, hogy a PMA teljesen hatástalan az S264A mutáns TRESK csatornán, kíváncsiak voltunk, mi történik, ha az S264 aminosav foszforilált állapotát próbáljuk utánozni glutamát szubsztitúcióval. A glutamát az S264E mutánsban utánozza a foszfoszerin negatív töltését és nyilvánvalóan olyan állapotban tartja a TRESK csatornát amit nem lehet módosítani az S264 szabályozási pont foszforilációjával. Az S264E mutáns TRESK csatornát sem aktiválta a PMA egyáltalán (11. ábra E). Ebben a sejtpreparátumban a vad típusú TRESK 2.9 ± 0.5 -szörösre aktiválódott PMA hatására (n=12), míg az S264E mutáns árama 0.94 ± 0.08 -szorosára változott (n=5), vagyis lényegében állandó maradt. Ez megerősítette az S264A mutánssal kapott eredményt; ha a csatorna foszforiláció-függő szabályozását az S264-es pozícióban lehetetlenné tesszük, akkor az kivédi a protein kináz C által okozott TRESK áram aktivációt.

A másik ismert szabályozó pozíció mutációja, a 14-3-3-kötést is meghatározó szerin 252 alaninra cserélése, nem befolyásolta a PMA hatását (3.2 ± 0.5 -szörös aktiváció, n=5, 11. ábra E, harmadik oszlop). Ez valószínűsíti, hogy a szerin 252 nem vesz részt a protein kináz C hatásának közvetítésében.

6.2 A PMA kezelést követően az ionomycin hasonló szintre aktiválja a TRESK áramot, mint az ionofór adása önmagában

Megvizsgáltuk, hogy a protein kináz C és kalcineurin egymást követő aktivációja, PMA-val (100 nM) és ionomycinnel (0.5 μ M), nagyobb TRESK áram növekedést okoz, mint a kalcineurin aktivációja önmagában, vagy ezek a kezelések ugyanazt a végső csatorna aktivációs szintet eredményezik. Ha a PMA hatása a S264 foszforilációs állapotának változásán keresztül érvényesül, akkor a PMA+ionomycin kezeléssel elért TRESK áram növekedés mértékének nem szabad meghaladnia a csak ionomycin által kiváltott aktivációét. A kalcineurin hatékonyan defoszforilálja az S264-et ionomycin alkalmazásakor, tekintet nélkül a PMA kezelés által korábban ugyanezen az aminosavmaradékon kifejtett hatására. Ionomycin adására a TRESK három percen belül maximálisan aktiválódik, majd az áram lassan, 10-30 perc alatt visszatér a kezdeti gátolt állapotába [122]. Ezzel szemben a PMA által létrehozott aktiváció sokkal lassabb, körülbelül 30-60 perc alatt éri el a maximumát [136].



12. ábra: A TRESK hasonló végső aktivitási szintet ér el ionomycin hatására PMA és 4α-PDD előkezelés után.

Reprezentatív TRESK áramok láthatók a PMA (100 nM, **A**) vagy az inaktív analóg 4α-PDD (100 nM, **B**) 44–48 percig tartó adása előtt (*bal oldali görbék*) és után (*jobb oldali görbék*). A második mérés végén ionomycint adtunk (0.5 μM, 160 s, *vízszintes piros vonal*). A kiindulási TRESK áramot (I₁), a forbol-észter utáni áramot (I₂) és a végső áramot az ionomycin kezelés végén (I₃) *függőleges nyilak* jelölik. A 2 mM [K⁺]-ban mért kis nonspecifikus (leak) áramokat a számításoknál levontuk az I₁, I₂ és I₃ értékekből.

C. A PMA (*lila, bal oszloppár*) és 4α-PDD (*szürke*) által kiváltott TRESK áram aktiváció normalizált értékét (I₂/I₁) kiszámítottuk az A és B panelen illusztrált kísérletből. Az ionomycin hatására ezt követően jelentkező aktiváció nagyságának becslésére az ionofór adása előtti és utáni áramokat hasonlítottuk össze (I₃/I₂, *középső oszloppár*). A végső (teljes) aktivációt az ionomycin utáni és a kiindulási áramok

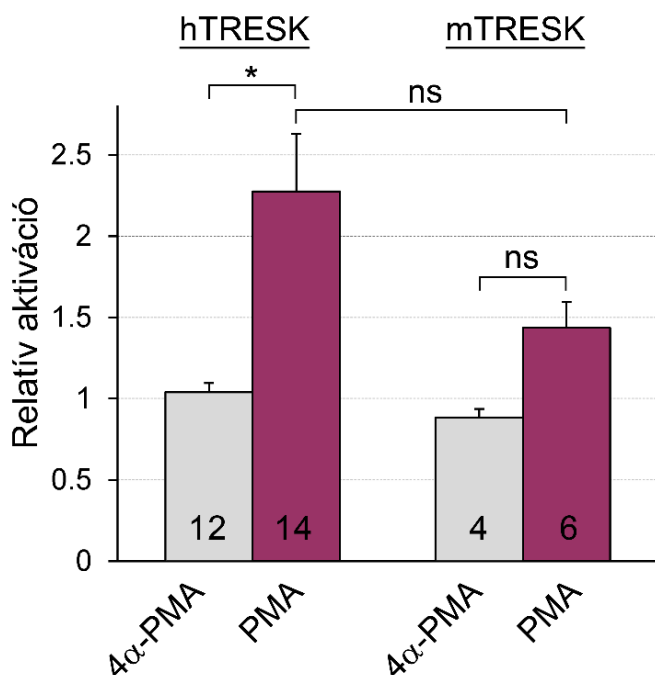
hányadosaként számítottuk (I₃/I₁, *jobb oszloppár*). A TRESK áram ugyanazt (a kb. 7-szeres) végső aktivációs szintet érte el PMA és 4α-PDD előkezelés után. ***p<0.0005, Mann-Whitney U test, Bonferroni korrekció után is szignifikáns; ns: nem szignifikáns.

Ezért a PMA+ionomycinn kombinált kezelés vizsgálatánál először megmértük a TRESK bazális áramot, ezután PMA-val (100 nM) kezeltük a sejteket 44-48 percig, majd megmértük a K^+ áramot újra és végül ionomycint (0.5 μ M) adtunk 160 másodpercig (ld. reprezentatív regisztrátumokat a 12. ábra A panelen). A kontroll (csak calcineurinnal aktivált) sejteket 4α -forbol-12,13-didekanoáttal (4α -PDD, 100 nM) kezeltük az ionomycin adása előtt, vagyis egy olyan forbol-észterrel, aminek nincs hatása a protein kináz C-re (12. ábra B). A PMA átlagosan több mint négyszeresére fokozta a TRESK áramot ebben a sejtpreparátumban, azonban a 4α -PDD nem hatott (12. ábra C, *első oszloppár*). Az ezt követő ionomycin adás a PMA-val kezelt sejtekben körülbelül még másfélszeresre növelte tovább a háttér K^+ áramot (12. ábra C, *harmadik oszlop*), így 6.6 ± 0.5 -szörös végső aktiváció jött létre a kísérlet kezdetén mért kiindulási áramhoz képest (n=11, 12. ábra C, *ötödik oszlop*). Az ionomycin erőteljesen növelte a háttér K^+ áramot a 4α -PDD-vel kezelt sejtekben, ami 8.0 ± 1.1 -szeres végső aktivációt eredményezett (n=12, 12. ábra C, *hatodik oszlop*). Az ionomycin utáni végső aktivációk nem voltak szignifikánsan különbözőek a PMA, illetve 4α -PDD kezelést követően (12. ábra C, *jobb oszloppár*), ami azt mutatja, hogy az ionomycin PMA után nem eredményezett nagyobb végső TRESK aktivitási szintet, mint az ionofór alkalmazása önmagában.

6.3 A PMA hatására az egér TRESK lényegesen kevésbé aktiválódik, mint a humán csatorna

A PMA hatását egy másik negatív kontroll forbol-észterrel is összehasonlítottuk a 11.A ábrán bemutatott két mérési módszerrel. A 4α -PMA szintén nem hat a protein kináz C-re és a kémiai szerkezetét tekintve még a 4α -PDD-nél is inkább hasonló a PMA-hoz. A humán TRESK csatorna áramát a 4α -PMA (100 nM) egyáltalán nem befolyásolta (ezzel Rahm és mtsai. eredményét megerősítettük [136]), olyan körülmények között amikor a PMA hatása egyértelműen jelentkezett (13. ábra).

Ugyanebben a sejtpreparátumban a PMA és 4α -PMA forbol-észtereket teszteltük az egér TRESK csatornán is. Az egér csatorna PMA általi aktivációja, átlagát tekintve kisebb volt (1.44 ± 0.16 -szoros, n=6), mint a humán csatornáé (2.27 ± 0.36 -szoros,



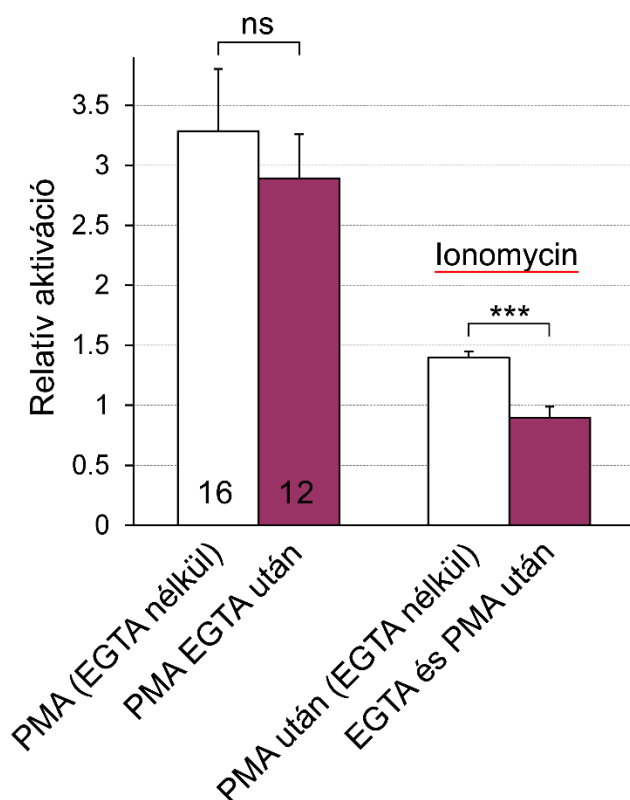
13. ábra: A humán és egér TRESK csatorna PMA által kiváltott aktivációjának összehasonlítása.

A humán és egér TRESK áramokat a PMA (100 nM, 49-56 min) vagy az inaktív analóg 4α-PMA adása előtt és után mértük. (A kezelést és a csatorna típust az oszlopok alatt és fölött jelöltük). A mérési protokoll megegyezett a 11.A ábrán bemutatottal. A forbol kezelés után mért áramot normalizáltuk a nyugalmi értékre, és az ábrán az átlagokat ábrázoltuk. * $p < 0.05$ Welch ANOVA majd Games-Howell teszt, ns: nem szignifikáns

n=14); valójában azonban nem különbözött szignifikánsan sem a humán csatornától, sem a 4α-PMA csoporttól (0.88 ± 0.06 -szoros áram változás, n=4), a mért sejtek aránylag alacsony száma miatt (13. ábra). Mivel tisztázni szeretnénk volna a kérdést, hogy az egér csatorna aktiválódik-e PMA hatására és az aktivációjának mértéke hogyan viszonyul a humán TRESK-éhez, ezért egy másik petesejt preparátumban is végeztünk méréseket. Ebben a preparátumban a PMA 2.1 ± 0.3 -szorosra aktiválta az egér TRESK áramát (n=6), a humán TRESK csatorna áramának növekedése pedig 3.7 ± 0.7 -szeres volt (n=11). A két kísérletről összesített adatokból számolva a PMA egér TRESK csatornára kifejtett aktiváló hatása szignifikánsnak bizonyult ($p < 0.05$, páros Wilcoxon próba (matched-pairs test)), habár a kis és sejtenként erősen változó válasz kiértékelése aránylag nagy elemszámot igényelt. Ha az összesített adatokat normalizáltuk a két kísérletben lényegesen eltérő humán TRESK aktivációra, akkor a humán és egér csatorna áramnövekedésében is szignifikáns különbséget kaptunk ($p < 0.01$, heteroszkedasztikus t-teszt). Összességében elmondhatjuk tehát, hogy az egér TRESK csatorna is aktiválódik PMA hatására, de a humán csatornánál jóval kevésbé, és ennek a sejtenként változó és csekély aktivációnak a statisztikailag megnyugtató kimutatása még a stabil *Xenopus* két elektródos feszültségzár mérés esetén is kihívást jelent.

6.4 A PMA a vad típusú humán TRESK csatornát nem a kalcineurinon keresztül aktiválja

A fent leírt kísérleti eredmények valószínűsítik, hogy a PMA által kiváltott TRESK aktiváció összefüggésben áll a szerin 264 foszforiláltsági állapotával. Emiatt még egyszer – a vad típusú TRESK csatornát felhasználva – szeretnénk volna megbizonyosodni arról, hogy a protein kináz C hatása nem a citoplazma $[Ca^{2+}]$ emelkedésén és kismértékű kalcineurin aktiváción alapul. Ezért a kalcineurin aktivációját nagy koncentrációjú kalcium kelátor EGTA intracelluláris mikroinjektálásával védtük ki (50 mM EGTA 50 nl térfogatban petesejtenként, az oldat szintén tartalmazott 50 mM HEPES puffert a pH stabilizálására). Régebben munkacsoportunk közölte, hogy ez a citoplazmában körülbelül 10-szeresére híguló kelátor oldat teljesen kivédi a TRESK kalcium-függő aktivációját [122]. A nyugalmi TRESK áram első mérését követően a sejtek egy részét injektáltuk EGTA-val, egy másik csoportjukat nem, majd ezt követően PMA-val (100 nM) kezeltük mindegyiket. A PMA kezelést követően másodszer is megmértük a TRESK áramot és végül ionomycint adtunk (vagyis azt a protokollt követtük, amit a 12.A ábrán ismertettünk).



14. ábra: Az EGTA injektálás kivédi a kalcineurin-függő TRESK aktivációt, de nem befolyásolja a PMA hatását.

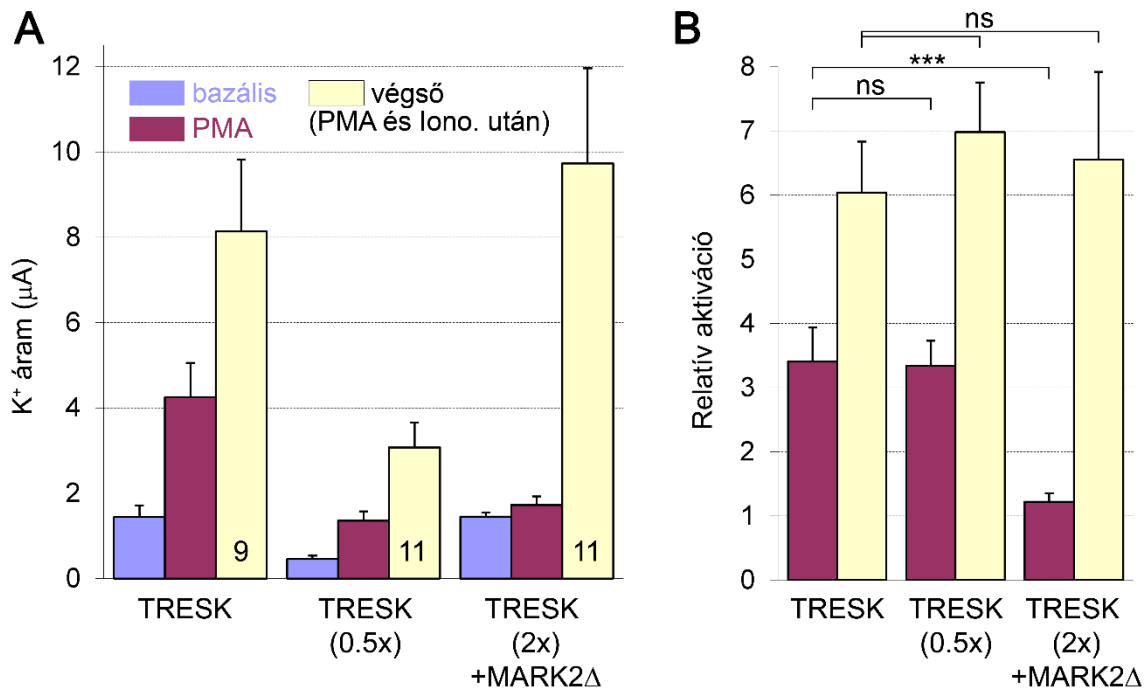
A 12.A ábrán bemutatott módszerrel vizsgáltuk a PMA és ionomycin TRESK aktiváló hatását. A sejtek egyik csoportját EGTA-val injektáltuk (lila, PMA EGTA után), a másikat nem (fehér, PMA EGTA nélkül), az első TRESK áram mérést követően, a PMA (100 nM) adása előtt. Az EGTA injektálás nem befolyásolta a PMA hatását (bal oszloppár). Végül ionomycint (0.5 μ M) adtunk, az ennek hatására jelentkező relatív aktivációt (I_3/I_2 a 12.A ábrán) ábrázoltuk (jobb oszloppár). Az EGTA kivédte az ionomycin aktiváló hatását. *** $p < 0.0005$ Mann-Whitney U teszt, Bonferroni korrekció után is szignifikáns; ns: nem szignifikáns.

A TRESK áram hasonlóan aktiválódott a PMA hatására az EGTA-injektálástól függetlenül (14. ábra, *jobb oldali oszloppár*). A nem injektált (*EGTA nélkül*) sejtek K^+ áramát az ionomycin körülbelül másfélszeresre tovább növelte a PMA kezelést követően (*harmadik fehér oszlop* a 14. ábrán), azonban az ionomycin nem tudta növelni az áramot az EGTA-val injektált sejtekben (*negyedik lila oszlop* a 14. ábrán). Ebből az következik, hogy az EGTA mikroinjektálás kivédte a kalcineurin aktiválódását, de nem befolyásolta a PMA által elindított csatorna szabályozási mechanizmust. Figyelembe véve az ionomycin hatásának teljes gátlását az EGTA-injektált sejtekben, az ilyen mértékű kalcineurin gátlásnak jelentősen csökkentenie kellett volna a PMA általi TRESK aktivációt, ha a PMA hatása a kalcineurintól függ. Ez azonban nem következett be, tehát igazoltuk a vad típusú csatorna felhasználásával is, hogy a PMA hatását a TRESK-re nem a kalcineurin közvetíti.

6.5 A csonkolt MARK2 kináz konstrukció koexpressziója a TRESK csatornával megszünteti a PMA hatását

Ha a PKC aktivációja közvetett módon a szerin 264 defoszforilációját eredményezi, akkor ezt a hatást ellensúlyozni lehet egy másik kináz koexpressziójával, ami az S264 aminosavat közvetlenül foszforilálja. Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy a "szerin klaszter" területét (S262, 264 és 267) a TRESK csatornában foszforilálja a mikrotubulus-affinitás-reguláló kináz család három tagja (MARK1-3, [140]). Ezért megkíséreltük a MARK2 kináz koexpressziójával kivédeni a PMA hatását. A MARK2 jelenlétében a PMA aktiváló hatása kis mértékben, de szignifikánsan csökkent (az adatokat nem mutatom). Arra gondoltunk, hogy esetleg a vad típusú MARK2 enzimet a PMA gátolhatja, mert mások leírták, hogy az "új típusú" (novel) PKC aktiválása PMA-val, a PKD kináz aktiválódásán keresztül, a MARK2 S400 pozíciójának foszforilációjához vezet és ezzel gátolja a MARK kináz aktivitást [170]. Ezért elkészítettük a MARK2 egy S400A mutáns változatát, amivel újra megkíséreltük a TRESK koexpressziót és a PMA hatás vizsgálatát. Azonban ez a konstrukció is csak mérsékelten gátolta a PMA hatását a TRESK-re. Végül az jutott eszünkbe, hátha az S400

foszforilációja csak részben felelős a novel PKC okozta MARK gátlásért, ezért megpróbáltuk eltávolítani a MARK2 hosszú C-terminális szabályozó régiójának egészét, elkészítettük a 361-es aminosavnál csonkolt MARK2 Δ konstrukciót. Amikor ezt koexpresszáltuk a TRESK csatornával, akkor a PMA hatására lényegében többé nem jött létre csatorna aktiváció (15. ábra).



15. ábra: A MARK2 konstrukció koexpressziója a humán TRESK csatornával megakadályozza a PMA aktiváló hatását.

A. Az ábrán a bazális TRESK áram, a PMA kezelés utáni áram és a végző ionomycin adást követő áram amplitúdók átlagos nagyságát tüntettük fel (*világoskék, lila és sárga* oszlopok, rendre, amelyek az I₁, I₂ és I₃ áramoknak felelnek meg a 12.A ábrán bemutatott mérési protokollnak megfelelően). Egy petesejt preparátumból származó sejtek három csoportját vizsgáltuk. Az első csoportban a petesejtek a humán TRESK csatornát expresszálták (*TRESK*), a másodikban alacsonyabb TRESK kifejeződést hoztunk létre feleannyi cRNS injektálásával (*TRESK 0.5x*), a harmadikban pedig kétszeres TRESK cRNS mennyiséggel együtt adtuk a MARK2 Δ cRNS-t (*TRESK(2x)+MARK2 Δ* , ahogy azt az *oszlophármasok* alatt jelöltük). **B.** Az A panelen bemutatott adatokból kiszámítottuk a TRESK áram relatív aktivációját PMA hatására (*lila*, I₂/I₁ a 11.A szerint) és az ionomycin utáni végző aktiváció mértékét (*sárga*, I₃/I₁ a 11.A szerint). A MARK2 Δ jelenlétében a PMA általi TRESK aktiváció nem jött létre (*lila* oszlopok), azonban az ionomycin hatását nem befolyásolta a kináz koexpressziója (*sárga* oszlopok). ***p<0.001, MANOVA, majd Tukey HSD teszt; ns: nem szignifikáns.

Ebben a kísérletben a 12.A ábrán ismertetett kísérleti eljárást követtük. Megmértük a TRESK bazális áramát, PMA-val (100 nM) kezeltük a sejteket, újra megmértük a TRESK áram nagyságát, majd létrehoztuk a végző maximális aktivációt

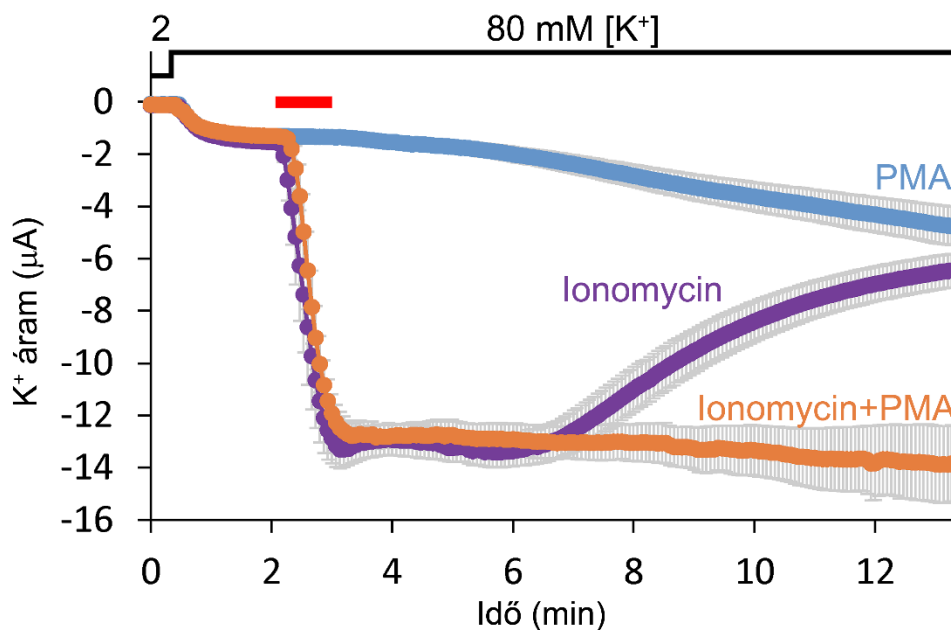
ionomycinnel. Olyan kontroll sejteket is vizsgáltunk (TRESK (0.5x)), amelyekbe csak feleannyi TRESK cRNS-t mikroinjektáltunk (három nappal korábban) és ezért kisebb csatorna expresszió jött létre bennük. Ennél a kontroll csoportnál jól látható, hogy az expresszió szintje, a háttér K^+ áram amplitúdó ebben a tartományban nem befolyásolta a számított aktivációk értékét. A MARK2 Δ koexpressziója a TRESK csatornával teljesen kivédte a PMA háttér K^+ áram növelő hatását (15. ábra, vö. *lila* oszlopokat). A kontroll csoportokban a PMA 3.4 ± 0.5 -szörös (TRESK, n=9), illetve 3.3 ± 0.4 -szeres (TRESK 0.5x, n=11) áram növekedést hozott létre, a MARK2 Δ -t kifejező csoportban viszont az áram csak elhanyagolható mértékben, 1.2 ± 0.2 -szeresére fokozódott PMA hatására (TRESK(2x)+MARK2 Δ , n=11). A PMA általi TRESK aktiváció csökkenése mindkét kontroll csoporthoz hasonlóan szignifikáns volt ($p < 0.001$).

A MARK2 Δ koexpressziója azonban nem tette lehetetlenné a TRESK csatorna aktivációját általában véve. A kísérlet végén alkalmazott ionomycin hasonlóan aktiválta a TRESK csatornát a MARK2 Δ kináz jelenlétében (6.6 ± 1.4 -szeres áram növekedés, TRESK(2x)+MARK2 Δ), mint a csak csatornát expresszáló kontroll csoportokban (6.0 ± 0.8 -szoros aktiváció a TRESK és 7.0 ± 0.8 -szoros a TRESK (0.5x) csoportokban, vö. a *sárga* oszlopokat a 15. ábra B panelen). Láthatóan a MARK2 Δ kináz koexpressziója a TRESK csatornával fenntartotta az S264 foszforilációját a PMA által okozott lassú defoszforilációs hatással szemben, azonban nem tudta ellensúlyozni a kalcineurin túláradó foszfatáz aktivitását, amikor az a csatornához közvetlenül kötődve defoszforilált.

A 15. ábrán bemutatott kísérletben kétszer annyi TRESK cRNS-t mikroinjektáltunk a MARK2 Δ cRNS-sel együtt, mint a (TRESK) kontroll sejtekbe, hogy körülbelül ugyanakkora bazális TRESK áramokat kapjunk a két csoportban. Egy hasonló korábbi kísérletben egyenlő mennyiségű TRESK cRNS-t injektáltunk a kontroll és MARK2 Δ -t is kifejező csoportokban (az adatokat nem mutatom). A MARK2 Δ koexpressziója ebben a kísérletben is teljesen kivédte a PMA hatását, azonban a bazális áram a MARK2 Δ -t is kifejező csoportban kisebb volt, mint a kontrollban.

6.6 A PMA lelassítja a TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcineurin-függő aktivációt követően

A TRESK áram visszatérése a nyugalmi (gátolt) állapotba a kalcineurin-függő aktivációt követően az S262-267 ("klaszter") szerineket foszforiláló kináz(ok) működésének következménye. A PMA hatását erre a kináz aktivitásra úgy vizsgáltuk, hogy megmértük a TRESK áram visszaállási sebességét az ionomycinnel történő aktivációt követően. A vad típusú humán TRESK csatornát kifejező petesejteket ionomycinnel (0.5 μM), vagy ionomycin és PMA (100 nM) kombinációjával ingereltük (*piros vastag vonal*), és a két csoportban összehasonlítottuk a K^+ áram visszatérését a nyugalmi állapotba (16. ábra, *lila* és *narancssárga* görbék).



16. ábra: A PMA+ionomycin kombinált ingerlés után a TRESK áram nem tér vissza a nyugalmi állapotba a mérés időtartamában.

A humán TRESK csatornát kifejező *Xenopus* petesejtek három csoportját ingereltük ionomycinnel (0.5 μM , *lila*), ionomycin és PMA (100 nM) kombinációjával (*narancs*), vagy csak PMA-val (*világoskék*), a vastag *piros* vonal által jelölt időtartamban (n=5 mindhárom csoportban, a standard hibát (S.E.) szürkével jelöltük). Az áramokat 300 ms hosszú, 4 másodpercenként ismételt feszültséglépések végén, -100 mV-on mértük, 2 vagy 80 mM extracelluláris $[\text{K}^+]$ -ban, ahogy azt a grafikon fölött jelöltük. Ha az ionomycin mellett PMA-t is adtunk a rövid ingerlés során, akkor a TRESK áram visszatérése a nyugalmi állapot irányába elmaradt (*narancs* színű görbe).

Az ingerlés hatására jelentkező áram maximumok megegyeztek a csak ionomycinnel ($12.5 \pm 1.1 \mu\text{A}$, $n=5$) és az ionomycin+PMA kombinációval kezelt csoportban ($11.5 \pm 0.8 \mu\text{A}$, $n=5$). Amikor csak ionomycint adtunk, a K^+ áram elkezdett visszatérni a nyugalmi érték felé, a mérés végén $6.5 \pm 0.6 \mu\text{A}$ értékre csökkent. Ezzel szemben az ionomycin+PMA csoportban egyáltalán nem tapasztaltunk K^+ áram csökkenést, a mérés végén az áram nagysága $13.8 \pm 1.4 \mu\text{A}$ volt ($p<0.002$, Student t-teszt). A csökkent mértékű áram visszaállás az ionomycin+PMA csoportban kompatibilis azzal a következtetéssel, hogy a PMA hatására gátlódik a TRESK csatornát foszforiláló kináz.

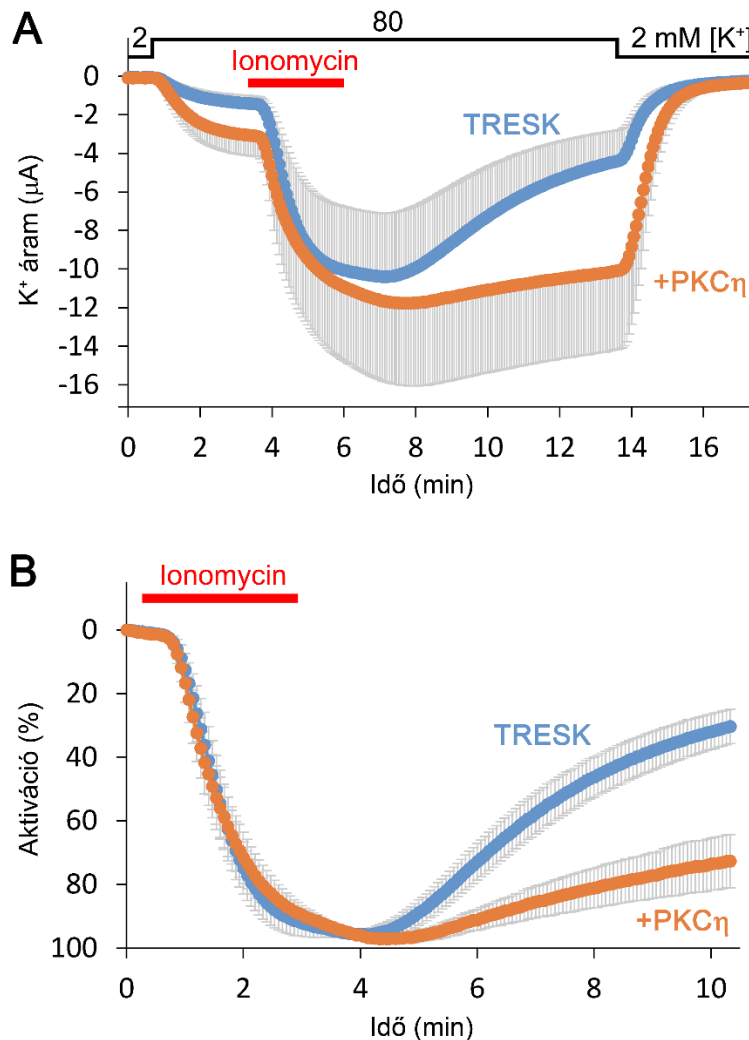
A kísérletben vizsgáltunk egy (ugyanabból a preparátumból származó) harmadik TRESK-et kifejező petesejt csoportot is, amit csak PMA-val ingereltünk (16. ábra, *világoskék* görbe). Ebben a csoportban lassú áram növekedés jelentkezett, ami a mérés végére $4.8 \pm 0.7 \mu\text{A}$ nagyságot ért el a $1.3 \pm 0.2 \mu\text{A}$ kiindulási értékről ($n=5$). Ez megfelel a PMA hatására kialakuló TRESK aktivációnak, ami láthatóan akkor is kifejlődik, ha a PMA nincs folyamatosan jelen, hanem csak egy rövid ingerlés formájában adjuk. Hasonló módon a PMA áramvisszaállást késleltető hatása is később jelentkezett, mint amikor a forbol-észtert adtuk (*narancssárga* görbe).

6.7 Az “új típusú” (novel-type) protein kináz C koexpressziója a TRESK csatornával olyan K^+ áram változásokat okoz, mint a PMA adása

Megklónoztuk az “új típusú” (novel-type) protein kináz C családba tartozó PKC δ , PKC ϵ , PKC η és PKC θ izoformákat egér agy RNS-ből reverz-transzkripciós polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) és megvizsgáltuk ezek koexpressziójának hatását a TRESK csatornára. Előzetes kísérletünkben a PKC θ nem befolyásolta a TRESK áram tulajdonságait, a PKC δ pedig aránylag kisebb hatást okozott (az adatokat nem mutatom), ezért ezekkel az izoformákkal a továbbiakban nem foglalkoztunk. A PKC η és PKC ϵ viszont egyértelműen hatott a TRESK áramra.

Ugyanabban a sejtpreparátumban a TRESK csatorna expressziója $1.4 \pm 0.4 \mu\text{A}$ bazális áramot eredményezett ($n=7$), a TRESK-et és PKC η kinázt koexpresszáló

sejtekben pedig $3.0 \pm 1.0 \mu\text{A}$ volt az alapáram átlagos nagysága ($n=5$). A különbség nem volt statisztikailag szignifikáns a csoportokon belüli csatorna expresszió nagyfokú változatossága miatt (vö. a *világoskék* és *narancssárga* görbékét a 17. ábra A panelen, az ionomycin adása előtti időpontban).



17. ábra: A PKC η koexpressziója a TRESK csatornával lelassítja az áram visszatérését a nyugalmi állapotba az ionomycinnel kiváltott aktivációt követően.

A. A humán TRESK csatornát expresszáló (*TRESK*, *világoskék*, $n=7$), vagy TRESK-et és PKC η -t koexpresszáló (*PKC η* , *narancssárga*, $n=5$) petesejtekben mért háttér K⁺ áramok átlagát ábrázoltuk. A TRESK áramot ionomycinnel ($0.5 \mu\text{M}$) aktiváltuk (*piros*), majd hosszan követtük az áram visszatérését a nyugalmi állapotba, 80 mM extracelluláris [K⁺]-ot tartalmazó oldatban. A [K⁺] változtatásokat az ábra fölött jelöltük. A görbéken csak pozitív vagy negatív irányban mutatjuk a szórásokat (*szürke*, S.E.). **B.** Az A panelen bemutatott áramok aktivációját normalizálva, százalékos értékekben ábrázoltuk. Az ionomycin adása előtt mért K⁺ áramot 0 % aktivációnak vettük, az ionomycin utáni maximális áram értéket pedig 100 %-nak. Az A panelen látható szórás legnagyobb részét a petesejtenként eltérő csatorna kifejeződés okozta, a csoportokon belül az áram visszatérési kinetikája sejtenként sokkal kisebb különbséget mutatott

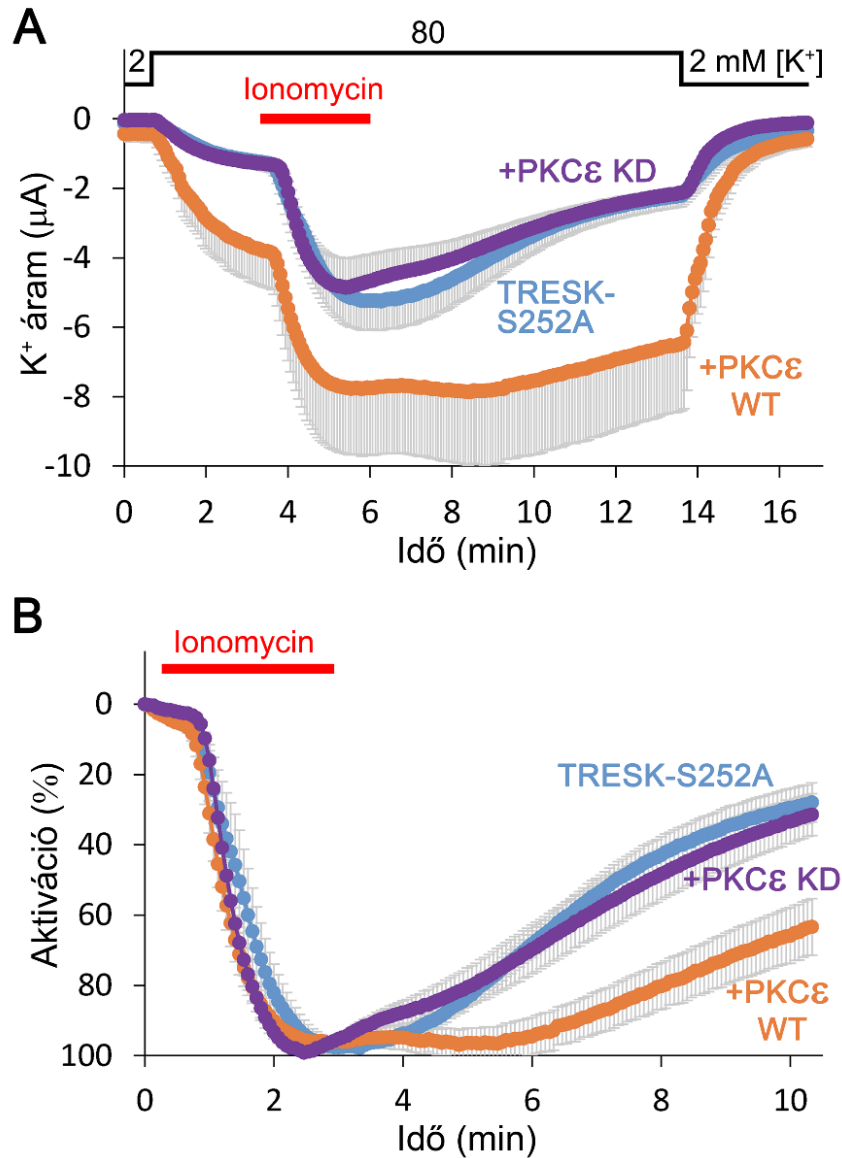
(ld. a *szürke* szórás jelölést a görbéken). A TRESK áram visszatérése az aktivált állapotból jóval lassabb volt a PKC η -t is kifejező csoportban.

Mindazonáltal, a TRESK áram ionomycin által kiváltott relatív aktivációja jóval nagyobb volt a csak csatornát kifejező sejtekben (7.3 ± 0.3 -szoros, $n=7$), mint a PKC η -t is koexpresszálóokban (4.2 ± 0.6 -szoros, $n=5$, $p<0.001$, Student t-teszt). A TRESK csatornát és PKC η kinázt koexpresszáló sejtekben megfigyelhető csökkent nagyságú relatív aktiváció ionomycin hatására és az aktivációt követően jó közelítéssel megegyező maximális áram értékek (17.A ábra) egybehangzók azzal, hogy a TRESK árama PKC η jelenlétében már részlegesen aktivált volt bazális körülmények között is, az ionomycin adása előtt.

A TRESK áram visszatérése a nyugalmi állapotba a kalcineurin-függő aktivációból szintén drámai módon különbözött a két csoportban. A kontroll, csak TRESK-et expresszáló csoportban az aktiváció a maximális érték 30 ± 5 %-ára tért vissza a mérés végén (17.B ábra, *TRESK, világoskék* görbe). Ezzel szemben a TRESK-et PKC η -val koexpresszáló csoportban a mérés végén az áram még 73 ± 8 %-ban aktivált maradt (+PKC η , *narancssárga* görbe, $p<0.001$, Student t-teszt). Ez az eredmény arra utal, hogy a TRESK csatorna gátló (újra)foszforilációját a PKC η erőteljesen csökkentette. A PKC η hatására megnövekvő TRESK (bazális) aktivitás és az ionomycin utáni áram visszaállás lassulása jól megfelel a PMA kezeléssel kapott farmakológiai eredményeknek, és megerősíti, hogy az "új-típusú" (novel-type) PKC a TRESK-et foszforiláló kináz gátlásával vesz részt a TRESK csatorna szabályozásában.

A fenti megfigyeléseket független kísérletben reprodukáltuk a humán TRESK-S252A mutáns és a vad típusú PKC ϵ izoforma koexpressziójával. Az S252 mutáció megakadályozza a foszforilációs szabályozást az S252 szabályozási ponton és egyben lehetetlenné teszi a 14-3-3 adapter fehérje kihorgonyzódását a szerint körülvevő RSN ζ CPE egyes típusú (mode I) 14-3-3-kötő konszenzus szekvenciához [142,147]. Ezért az S252A mutáns segítségével megítélhetjük, hogy az S252 aminosavat célzó szabályozási folyamatok, illetve a 14-3-3 kapcsolódása ehhez a kötőhelyhez feltétlenül szükségesek-e a novel PKC hatásához. Az S252A mutánsban a TRESK két ismert szabályozó régiója közül csak a "szerin klaszter" maradt ép. Mindemellett ebben a kísérletben azt a kérdést is vizsgáltuk, hogy a TRESK áramra kifejtett hatáshoz tényleg szükség van-e a novel PKC enzimaktivására. Ezért egy olyan PKC ϵ konstrukció

koexpresszióját is teszteltük a TRESK csatornával, amiben a kináz domén enzimaktivitását a K437R mutációval elrontottuk [171].



18. ábra: A vad típusú PKC ϵ koexpressziója az S252A mutáns TRESK csatornával lelassítja az áram visszatérését a nyugalmi állapotba az ionomycinnel kiváltott aktivációt követően, azonban a kináz-inaktív K437R mutáns PKC ϵ nem okoz ilyen hatást.

A. A humán TRESK S252A mutáns csatornát expresszáló (*TRESK-S252A*, világoskék, n=5), vagy TRESK-S252A-t és vad típusú PKC ϵ -t koexpresszáló (*+PKC ϵ WT*, narancssárga, n=7), vagy TRESK-S252A-t és kináz-inaktív K437R mutáns PKC ϵ -t koexpresszáló (*+PKC ϵ KD*, lila, n=7) petesejtekben mért háttér K⁺ áramok átlagát ábrázoltuk. A TRESK áramot ionomycinnel (0.5 μ M) aktiváltuk (*piros*), majd hosszán követtük az áram visszatérését a nyugalmi állapotba, 80 mM extracelluláris [K⁺]-ot tartalmazó oldatban. A [K⁺] változtatásokat az ábra fölött jelöltük. A görbéken csak pozitív vagy negatív irányban mutatjuk a szórásokat (*szürke*, S.E.). **B.** Az A panelen bemutatott áramok aktivációját normalizálva, százalékos értékben ábrázoltuk. Az ionomycin adása előtt mért K⁺ áramot 0 % aktivációnak vettük, az ionomycin utáni maximális

áram értéket pedig 100 %-nak. A TRESK áram visszatérése az aktivált állapotból lassabb volt a PKC ϵ -t is kifejező csoportban (*narancs*), azonban megegyezett a csak TRESK-S252A-t kifejező kontroll sejtek görbéjével (*világoskék*) a kináz-inaktív PKC ϵ -t is kifejező csoportban (*lila*).

A TRESK-S252A csoportban a bazális áram átlagos nagysága $1.2 \pm 0.2 \mu\text{A}$ volt ($n=5$), a vad típusú PKC ϵ -t koexpresszáló sejtekben pedig $3.6 \pm 1.0 \mu\text{A}$ ($n=7$). Az előző kísérlethez hasonlóan az expressziós szintek jelentős szórást mutattak, és az átlagban látható háromszoros különbség nem volt szignifikáns. Abban különbözött viszont az előző kísérlettől az eredmény, hogy az áram nagysága valamivel nagyobbnak tűnt az ionomycinnel történő ingerlést követően is a vad típusú PKC ϵ jelenlétében ($7.7 \pm 1.9 \mu\text{A}$), mint a csak csatornát kifejező csoportban ($5.2 \pm 0.9 \mu\text{A}$). (Ezeket az áram nagyságokat az egyedi áram regisztrátumokból számítottuk pontosan, a maximális (nagyságú befelé irányuló) áram értékből a 2 mM [K⁺]-ban mért nem specifikus (leak) áram levonásával, de a 18. ábra A panelen látható *világoskék* és *narancssárga* átlag görbék maximális értékei is aránylag jól reprezentálják a különbséget). A csúcsáramok közötti különbség nem volt szignifikáns ($p=0.32$, Student t-teszt), ezért az a legvalószínűbb, hogy a különbség megjelenése csupán az expressziós szint sejtek közötti véletlen ingadozásából adódott. Természetesen nem zárhatjuk ki teljesen azt a lehetőséget sem, hogy a vad típusú PKC ϵ koexpressziója kis mértékben (átlagban mintegy 50 %-kal) fokozta a TRESK-S252A csatorna expressziót.

Amíg az abszolút áram nagyságok összehasonlítása – a PKC η -val végzett kísérlethez hasonlóan – ebben a kísérletben sem vezetett szignifikáns különbségre, addig a származtatott (önkontrollosan meghatározott) paraméterek itt is teljesen világos eredményt adtak. A csak TRESK-S252A csatornát kifejező csoportban a K⁺ áram ionomycin általi aktivációja 5.1 ± 0.6 -szoros volt, a vad típusú PKC ϵ koexpressziója viszont ezt 2.5 ± 0.2 -szeresre csökkentette ($p<0.05$). A relatív aktiváció tehát körülbelül felére csökkent, a bazális áram körülbelül háromszorosra nőtt amellet, hogy a csúcsáram mintegy 50%-kal volt a PKC ϵ csoportban nagyobb. Mindezek az eredmények azt sugallják, hogy a vad típusú PKC ϵ hatására a TRESK bazális aktivitása mintegy kétszeresére fokozódott.

A TRESK-S252A csoportban a K⁺ áram az ionomycin elvonását követően, a mérés végére a maximális aktiváció 28 ± 6 %-ára tért vissza (18. ábra B panel, *világoskék* görbe). Ezzel szemben a TRESK-S252A+PKC ϵ WT csoportban (*narancssárga*) az áram visszatérése a nyugalmi állapotba szignifikánsan lassabb volt, a mérés végén az aktiváció

63 ± 8 %-a még fennmaradt ($p < 0.01$, ANOVA, majd Tukey HSD teszt). Ugyanebben a kísérletben a K437R kináz-inaktív mutáns koexpressziója (+PKC ϵ KD) nem befolyásolta a TRESK áram tulajdonságait, a *lila* görbék együtt futnak a TRESK-S252A kontroll csoport *világoskék* görbéivel a 18. ábra A és B paneleken.

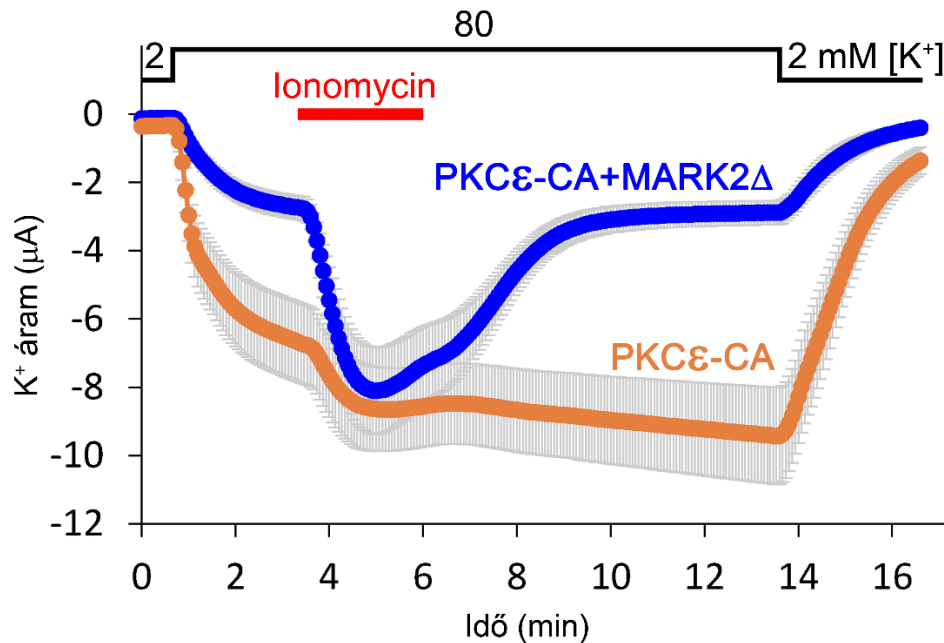
Összességében tehát elmondható, hogy a vad típusú PKC ϵ alkalmazásával reprodukáltuk a PKC η -val kapott eredményeket. Emellett igazoltuk, hogy az S252 szabályozási pont működése és a 14-3-3 adapter fehérje kihorgonyzódása a csatornához nem nélkülözhetetlen a PKC által kiváltott TRESK aktiváció során, viszont a PKC ϵ kináz enzimaktivitása elengedhetetlen a hatás kialakulásához.

6.8 A MARK2 Δ ellensúlyozza a konstitutívan aktív PKC ϵ hatását a TRESK aktivációra és visszaállási kinetikára

A fenti kísérletekben a vad típusú PKC η és PKC ϵ koexpressziója is jól mérhető módon befolyásolta a TRESK aktivitását és szabályozását. Ehhez a vad típusú enzimre jellemző alapaktivitáshoz képest azonban az "új-típusú" PKC izoformák még jelentős mértékben aktiválódhatnak a megfelelő fiziológias szabályozásuk hatására. Ezt az aktiváltabb állapotot utánozza a PKC ϵ konstitutívan aktív A159E mutáns változata (PKC ϵ -CA), amiben a pszeudoszubsztrát szekvencia alaninját negatív glutamátra cseréltük [171]; az A159E mutáns az irodalmi adatok szerint a vad típusú enzim maximális aktivitásának 65 %-át mutatja [172]. Ezt a nagyobb aktivitású PKC ϵ változatot használtuk a TRESK áram módosítására abban a kísérletünkben, amiben a MARK2 Δ konstrukcióval fenntartott "szerin klaszter" foszforiláció hatását vizsgáltuk a TRESK PKC-függő szabályozására.

Abban a petesejt csoportban, amiben a TRESK csatornát a PKC ϵ A159E mutáns változatával koexpresszáltuk, a bazális áram átlagos nagysága 6.5 ± 1.2 μ A volt (n=10, 19. ábra, *narancssárga* PKC ϵ -CA görbe). Ezekben a sejtekben az ionomycin adására alig jött létre K⁺ áram növekedés, a relatív aktiváció mértéke 1.5 ± 0.1-szeresnek adódott. Ha viszont a TRESK és PKC ϵ -CA mellett a MARK2 Δ kinázt is koexpresszáltuk (háromszoros koexpresszió), akkor az alapáram 2.6 ± 0.6 μ A nagyságúra csökkent (n=9,

$p < 0.01$, heteroszkedasztikus t-teszt, 19. ábra, *kék* $PKC\epsilon$ -CA+MARK2 Δ görbe). A csökkent bazális áramon kívül, az ionomycin hatására létrejövő relatív aktiváció is lényegesen nagyobb volt ezekben a MARK2 Δ -t is kifejező sejtekben (3.2 ± 0.3 -szoros növekedés, $p < 0.002$, heteroszkedasztikus t-teszt).



19. ábra: A MARK2 Δ helyreállítja a TRESK bazális gátlását a PKC ϵ jelenlétében és felgyorsítja az áram visszatérését a nyugalmi állapotba az ionomycin elvonása után.

A K⁺ áramok átlaga látható olyan *Xenopus* petesejtekben, amelyek a humán TRESK csatornával koexpresszálják a konstitutívan aktív A159E mutáns PKC ϵ -t ($PKC\epsilon$ -CA, *narancssárga*, $n=10$), vagy koexpresszálják a MARK2 Δ -t is a TRESK és PKC ϵ -CA mellett (háromszoros koexpresszió, $PKC\epsilon$ -CA+MARK2 Δ , *kék*, $n=9$). A sejteket ionomycinnel ($0.5 \mu\text{M}$) stimuláltuk, ahogy a *piros* vonal mutatja. Az ábrázolás módja megfelel a 17. és 18. ábrán bemutatottnak. A MARK2 Δ jelenlétében a kiindulási áram kisebb volt, azonban az áramok ionomycin adása során mért maximális nagysága megegyezett. Az áram visszatérése a nyugalmi állapotba szintén felgyorsult a MARK2 Δ hatására az ionomycin elvonása után.

A MARK2 Δ hatására szignifikánsan csökkent a bazális áram, az ionomycin után mért ugyanakkora maximális áram nagyság mellett, illetve ezeknek megfelelően a relatív aktiváció szignifikánsan fokozódott, mely eredmények egymást erősítve alátámasztják a következtetést, miszerint a MARK2 Δ ellensúlyozta a PKC ϵ -CA csatornaaktiváló hatását nyugalmi körülmények között. Mindemellett a MARK2 Δ teljesen nyilvánvalóan befolyásolta a TRESK áram visszaállási kinetikáját az ionomycin elvonását követően. A $PKC\epsilon$ -CA csoportban a TRESK áram nem is kezdte meg a visszatérést a nyugalmi állapot irányába az ionomycin kimosását követően; az aktivitás 154 ± 25 %-os szintet ért el a

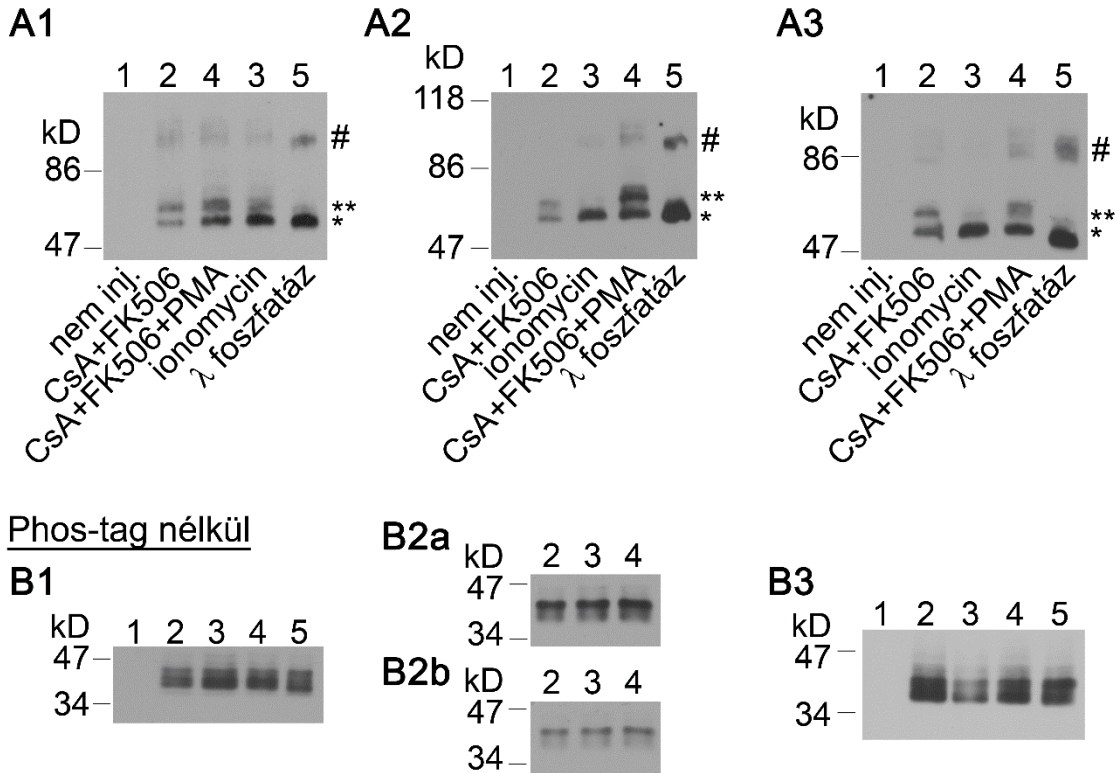
mérés végén, ha az ionomycin adása végén mért aktivitási szintet tekintjük 100%-nak. Ezzel szöges ellentétben, a MARK2 Δ teljes áram visszaállást eredményezett mintegy 5 percen belül az ionomycin elvonása után, a mérés végén az aktiváció 9 ± 5 %-a maradt fenn ($p < 0.0005$, Mann-Whitney U teszt, 19. ábra, *kék görbe*).

Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a konstitutívan aktív PKC ϵ rendkívül erőteljesen fokozta a TRESK bazális aktivitást. Ezután az ionomycin is csak másfélszeresére tudta tovább aktiválni az áramot. A csatornák többsége már eleve is defoszforilált állapotban lehetett, mivel a konstitutívan aktív PKC ϵ erősen gátolta a "szerin klaszter" foszforiláló endogén kinázt. A PKC ϵ hatása iránt érzéketlenné tett MARK2 Δ viszont helyreállította a "szerin klaszter" bazális foszforilációját és a TRESK nyugalmi gátolt állapotát, illetve felgyorsította a csatorna visszafoszforilálódását az ionomycin hatására létrejövő defoszforilációt követően.

6.9 A sejtek kezelése PMA-val a TRESK fehérje defoszforilációját eredményezi

Phos-tagTM SDS-PAGE módszerrel vizsgáltuk a TRESK protein foszforilációs állapotát a *Xenopus* oocytákból származó plazma membrán preparátumokban. Ez a módszer az SDS-PAGE gél mátrixba kovalensen kötött Phos-tagTM reagensen alapul, aminek Zn²⁺ komplexe reverzibilisen köti a foszforproteinek foszfát csoportját, és csökkenti azok mobilitását az elektroforézis folyamán a defoszforilált fehérjéhez képest. Az így szétválasztott fehérjéket az elektroforézist követően nitrocellulóz membránra blottoltuk és a TRESK proteint anti-HA immunoblot módszerrel jelenítettük meg.

A TRESK fehérje N-glikozilációját az N70Q mutációval akadályoztuk meg, ami jelentősen csökkentette a csatorna alegység glikozilációból adódó molekulásúly heterogenitását. Emellett beépítettünk a csatorna N-terminálisába egy dupla (humán) influenza hemagglutinin epitóp címkét (dupla HA-tag, ld. a Módszerek fejezetben az 5.2 pontot). Ez a címke megfelelő intenzitású jelet adott a Phos-tag SDS-PAGE után végzett Western blot kísérletekben. A Phos-tag módszer alkalmasnak bizonyult a TRESK *in vivo* defoszforilációjának vizsgálatára (20. ábra), azonban alkalmazása során a módszerrel kapcsolatban előre nem várt anomáliákra is fény derült.

15 μ M Phos-tag

20. ábra: A TRESK fehérje PMA hatására létrejövő defoszforilációját Phos-tag SDS-PAGE módszerrel és anti-HA immunoblottal mutattuk ki.

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

A negatív kontroll csoportban a HA₂-N70Q-hTRESK konstrukciót kifejező petesejteket 45 percig inkubáltuk ciklosporin A (CsA, 1 μM) és FK506 (1 μM) kalcineurin gátlószerek jelenlétében. Az ezekből a sejtekből tisztított TRESK fehérje, ami a csatorna foszforilált, nyugalmi állapotának felelt meg, két halvány csík formájában jelentkezett a Phos-tag gélekről készített Western blot képeken (CsA+FK506, 2. sáv az A1-3 képeken, 20. ábra). Ha ugyanennek a preparátumnak ugyanannyi petesejtjéből ugyanekkora mennyiségű TRESK fehérjét *in vitro* defoszforiláltunk a nem-szelektív λ foszfatázzal (40 U/μl), akkor egy nagyon intenzív alsó csíkot kaptunk eredményül (λ foszfatáz, 5. sáv az A1-3 képeken, 20. ábra). Ez az eredmény azt jelenti, hogy a 2-es sávokban megfigyelhető felső csík (**) a foszforilált TRESK fehérjének felel meg, aminek a mobilitása tényleg csökkent a defoszforilált csatorna alegységhez képest (alsó csík, *), jó összhangban azzal, amit a Phos-tag gyártója a használati utasításban ír. Mindazonáltal, elkerülhetetlen az a következtetés, hogy a foszforilált TRESK csatornát a módszer sokkal alacsonyabb hatásfokkal detektálja, mint a defoszforilált fehérjét. Ha összehasonlítjuk az ugyanakkora teljes TRESK fehérje mennyiséget tartalmazó 2-es és 5-ös sávot, és figyelembe vesszük a nagyon intenzív alsó csíkot az 5-ös sávban, akkor nyilvánvalóvá válik, hogy a foszforilált TRESK fehérje egy jelentős (legnagyobb) hányada láthatatlan maradt a CsA+FK506 csoportban a 2-es sávban. A további adatokat csak akkor értelmezhetjük helyesen, ha ezt a következtetést elfogadjuk.

A λ foszfatázos reakción kívül egy másik pozitív kontrollt is használtunk, amikor a TRESK defoszforilációt *in vivo* hoztuk létre. Ebben a reakcióban ionomycinnel (1 μM, 3 min) kezeltünk ugyanannyi petesejtet a kalcineurin inhibitorok nélkül, mint a CsA+FK506 negatív kontroll csoportban. Miután a TRESK fehérjét ilyen módon defoszforiláltattuk a kalcineurinnal az élő sejtben, egy kifejezett, intenzív alsó csík jelent meg a Phos-tag kísérletben (mind a három reprezentatív kísérletben jól látható módon, *ionomycin*, 3-as sávok, 20. ábra A1-A3). A TRESK fehérje számottevő része tehát a defoszforilációnak megfelelő pozícióba vándorolt az *in vivo* kalcineurin aktiválás hatására, és ezért az alsó csík jóval intenzívebbé vált, mint a CsA+FK506 negatív kontroll csoportban (vö. a 2-es és 3-as sávokat a 20. ábra A1-A3 paneleken). Ezzel a kísérlettel először mutattuk ki közvetlen módon, hogy a citoplazma [Ca²⁺] növekedés hatására a TRESK csatornafehérje tényleg defoszforilálódik a plazmamembránban.

A *CsA+FK506*, λ foszfatáz és *ionomycin* kontroll csoportokkal kapott eredmények megmutatták, hogy a TRESK defoszforilációja nagy intenzitású alsó csík (*) formájában jelentkezik a Phos-tag gélen, ami a fehérje jól detektálható frakciójának felel meg. Két mintában tehát összehasonlíthatjuk a TRESK defoszforilációját a Phos-tag gélen jelentkező alsó csíkok intenzitása alapján, ha ezek a minták egyébként egyenlő mennyiségben tartalmazzák a TRESK összfehérjét (foszforilált+defoszforilált). A TRESK összfehérje mennyiséget pedig hagyományos SDS-PAGE futtatást követő Western blottal ítéldhetjük meg, ami nem választja szét a foszforilált és defoszforilált frakciókat, vagyis az összes TRESK fehérje egy csíkba fut (20. ábra, B1-B3).

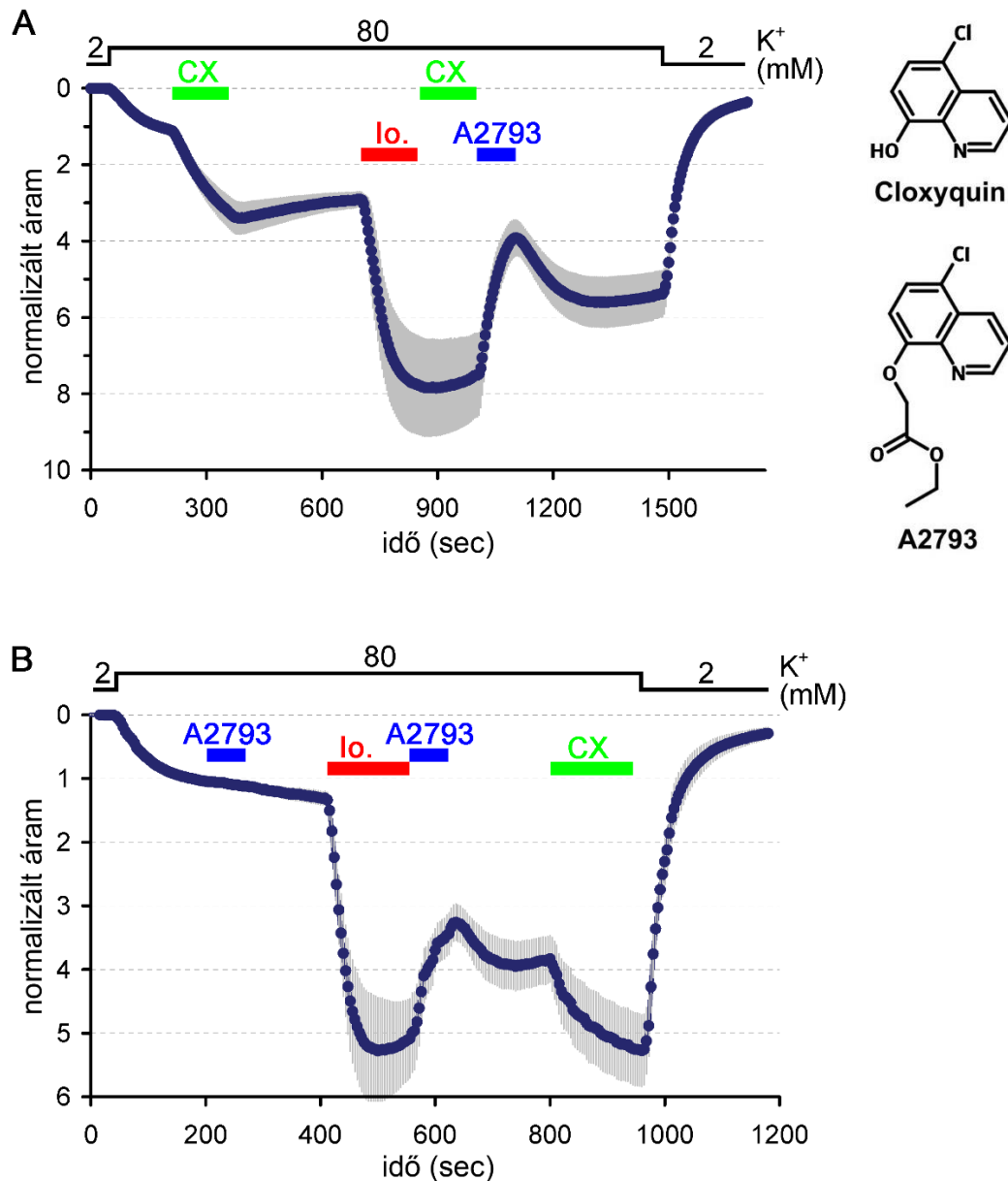
A PMA hatását a TRESK foszforiláltsági állapotára a fenti alapelvek segítségével határoztuk meg. Ugyanannyi petesejtet, mint a *CsA+FK506* kontroll csoportban, PMA-val (100 nM) inkubáltunk 45 percig, CsA (1 μ M) és FK506 (1 μ M) jelenlétében. A TRESK összfehérje mennyiséget nem változtatta meg a PMA-val végzett kezelés a petesejtekből tisztított plazmamembrán frakcióban (vö. a 2-es és 4-es sávokat a 20. ábra B1-B3 paneleken). A második reprezentatív kísérletben egy nagyon röviden exponált film képét is mutatjuk, ezzel illusztrálva a TRESK összfehérje pontosan egyenlő mennyiségét a két mintában (vö. a 2-es és 4-es sávokat a 20. ábra B2b panelen). Ha ugyanezeket a mintákat Phos-tag gélen analizáltuk, akkor az alsó csík minden kísérletben intenzívebb volt, mint a kontroll csoportban (vö. a 2-es és 4-es sávokat a 20. ábra A1-A3 paneleken). Mindösszesen ötször hajtottuk végre ezt az összehasonlítást független petesejt preparátumokban és az adatokat denzitometriával elemeztük. A háttér intenzitás levonása után a denzitometriás adatokat normalizáltuk az *ionomycin* hatására létrejövő (maximálisnak tekintett) defoszforiláció értékére mind az öt független kísérletben. A defoszforilált TRESK csatornának megfelelő alsó csík intenzitása mind az öt esetben növekedett a PMA hatására. Az alsó csík normalizált denzitás értékek a két csoportban (*CsA+FK506* vs. *CsA+FK506+PMA*) szignifikánsan különböztek ($p < 0.01$, Mann-Whitney U teszt), ami egyértelműen igazolja, hogy a TRESK fehérje defoszforilálódott a sejtekben a PMA kezelés hatására.

Mindemellett a PMA-val kezelt csoportban megjelent egy jól kivehető csík a foszforilált TRESK fehérjék tartományában is. Habár nem változtatja meg a fenti következtetést, joggal merül fel a kérdés, hogy ez a csík honnan származik. Ez a csík változó intenzitással megfigyelhető mindhárom reprezentatív Western blot képen;

legkifejezettebb a 4-es sávban a 20. ábra A2 panelen. A PMA-val kezelt sejtekben megjelenő, foszforilált TRESK tartományba eső csík pozíciója kissé eltér a kontroll CsA+FK506 csoport felső csíkjának elhelyezkedésétől. Vagyis ez a csík csak a PMA-val kezelt sejtekben jelenik meg és nagyobb detekciós határfok jellemző rá, mint a CsA+FK506 csoport nagy mennyiségű foszforilált TRESK fehérjéire. Ezek az adatok konzisztensek azzal a hipotézissel, hogy a TRESK fehérje a PMA hatására foszforilálódik egy (vagy több) helyen, a nyolc feltételezett PKC foszforilációs konszenzus szekvenciájának valamelyikén, azon felül, hogy a csatorna szabályozásban fontos regulációs helyén (S264) defoszforilálódik. Vagyis a plussz csíkért a TRESK csatorna regulációs szerinectől eltérő helyzetű, PKC általi direkt foszforilációja lehet felelős.

6.10 Az A2793 cloxyquin származék a TRESK csatorna állapot-függő gátlását okozza, de a cloxyquintól eltérően a defoszforilált csatornán hat jobban

Munkacsoportunk a közelmúltban Prof. Mátyus Péter munkacsoportjával kollaborációban cloxyquin analógokat fejlesztett ki. Érdekes módon a származékok között akadtak olyanok, amelyek a cloxyquintól eltérően nem aktiválták a TRESK csatornát, hanem gátolták azt. Munkacsoportunk Ph.D. hallgatója, dr. Lengyel Miklós (prof. Enyedi Péter témavezetésével) elvégezte a cloxyquin származékok átfogó vizsgálatát az egér K_{2P} csatornákon, és az A2764 analógot sikeresen felhasználta a TRESK áram elkülönítésére egérből izolált hátsó gyöki ganglion idegsejtekben. Az eredményekből első szerzős közleménye született a *Molecular Pharmacology* folyóiratban, amiben én is társszerző vagyok, és a közlemény adatait felhasználta Ph.D. dolgozatában. Ennek megfelelően az alábbiakban nem publikált mérési eredményt mutatok be az egyik (A2793) cloxyquin származék humán TRESK csatornára kifejtett hatásáról (21. ábra).



21. ábra: A cloxyquin a TRESK nyugalmi áramát aktiválja, az A2793 viszont a nyugalmi áramra nem hat és a kalcium-függő aktiváció után gátol.

A humán TRESK csatornát kifejező *Xenopus* petesejtek K⁺ áramára cloxyquin (100 μM), A2793 (50 μM) és ionomycin (0.5 μM) által kifejtett hatások összefüggését tanulmányoztuk. **A.** A mérés kezdetén a bazális TRESK áramot cloxyquin adásával aktiváltuk (CX, világoszöld, n=5). Hosszú kimosást követően létrehoztuk a TRESK csatorna kalcium-függő aktivációját ionomycinnel (Io., piros), majd az áram stabilizálódása után rögtön újra cloxyquint adtunk. A lényegében hatástalan cloxyquin után az A2793 (kék) gátolta az áramot. Az extracelluláris [K⁺] változtatásait a regisztrátumok fölött jelöltük, az áramokat -100 mV-on mértük 300 ms hosszú feszültséglépések végén. Az ábra jobb oldalán a cloxyquin és az A2793 képlete látható. **B.** A mérés kezdetén a bazális TRESK áramot az A2793 (kék) nem befolyásolta, ha viszont az áramot aktiváltuk ionomycinnel (Io., piros), akkor ezután az A2793 már létrehozta a gátló hatást (n=6). Hosszú kimosási periódus után a cloxyquin (CX, világoszöld) az időközben a nyugalmi állapot irányába részlegesen visszatérő TRESK áramot újra a maximumára aktiválta.

A humán TRESK csatornát kifejező petesejtek egy csoportjában először cloxyquint (100 μM) adtunk, ami az irodalmi adatoknak és korábbi méréseinknek megfelelően jelentősen (3.4 ± 0.4 -szeresére, $n=5$) aktiválta a nyugalmi állapotú háttér K^+ áramot (21. ábra, A panel, *CX*, világoszöld). Ezúttal nem vártuk meg a lassan kialakuló aktiváció telítési fázisát, hanem inkább megvizsgáltuk a hatás reverzibilitását. A cloxyquin hatása azonban a hosszú (több mint 5 perces) kimosási fázis végére sem csökkent számottevő mértékben, az aktiváció a kimosás végén még mindig 2.9 ± 0.2 -szeres maradt. Ezt követően a TRESK csatornát ionomycinnel (0.5 μM , *Io.*, piros) aktiváltuk, az áram a csatorna defoszforiláció miatt az alapérték 7.8 ± 1.2 -szeresére növekedett. Az aktivációs fázis telítődésekor, az ionomycin elvonásával egyidejűleg újra cloxyquint (100 μM , *CX*, világoszöld) adtunk, azonban az áramot ez észrevehetően nem fokozta. A cloxyquin elvonásakor alkalmazott A2793 (50 μM , *kék* jelölés a 21.A ábrán) az áramot gyorsan gátolta, az áram az alapérték 3.9 ± 0.5 -szörösére csökkent. Annak ellenére gyorsan létrejött a gátlás, hogy a petesejt membránjában oldva a cloxyquin még valószínűleg jelen volt, tekintve az aktivátor korábban mért lassú kimosódását. A mérést hosszú kimosási periódussal zártuk, amikor is két fő hatás érvényesült, az A2793 gátló hatásának lecsengése gyorsabb átmeneti áram növekedésben nyilvánult meg, emellett jelentkezett a csatorna áramának lassú visszatérése a nyugalmi állapotba, a TRESK foszforiláció miatti áram csökkenés formájában. A mérés legvégén az EC [K^+]-ot 2 mM-ra csökkentettük, ami megszüntette a háttér K^+ áramot, vagyis a sejtek nem-specifikus csurgó áram (leak) kialakulása nélkül átvészelték a közel félórás mérési periódust (21.A ábra).

A humán TRESK csatornát kifejező petesejtek másik csoportjában először A2793-at (50 μM) adtunk, ez azonban nem gátolta a TRESK bazális áramát (21. ábra, B panel, A2793, *kék*). Ezt követően a TRESK csatornát defoszforiláltuk, az áram ionomycin (0.5 μM , *Io.*, piros) hatására 5.3 ± 0.8 -szorosára aktiválódott ($n=6$). Az ionomycinnel aktivált TRESK áramot az A2793 (50 μM , *kék*) az alapérték 3.3 ± 0.3 -szorosára csökkentette. Ezután megkíséreltük az A2793 kimosását; a gátlószer hatása legalább részlegesen reverzibilisnek bizonyult, mert a K^+ áram átmenetileg növekedni kezdett. Amikor ez a növekedés leállt és csatorna foszforiláció miatti áram csökkenés vált uralkodóvá, akkor cloxyquint (100 μM , *CX*, világoszöld) adtunk, ami a K^+ áramot újra az

alapérték 5.3 ± 0.6 -szorosára növelte (21.B ábra). Ezekben a sejtekben sem keletkezett számottevő nem-specifikus csurgó áram (leak) a mérés folyamán.

Eredményeink igazolják, hogy az A2793 a TRESK áram állapotfüggő gátlását hozza létre. A gátlószer nem befolyásolja a TRESK bazális áramát, viszont a calcineurin-függő csatorna defoszforiláció után az aktivált áramot jelentős mértékben (kb. 30-50%-kal) gátolja az itt bemutatott kísérletekben használt 50 μM -os szubmaximális gátló koncentrációban. Ez lényegében fordítottja a cloxyquin állapot-függő TRESK aktivációjának, hiszen a munkacsoportunk korábban közölt adatai szerint a humán TRESK csatorna bazális áramát a cloxyquin 100 μM -os koncentrációja körülbelül négyszeresére aktiválja, viszont a calcineurin-függő aktivációt követően az áramot legfeljebb 20-25%-kal képes fokozni [165]. A kísérleti adatok szemléletesen igazolják, hogy a cloxyquin és A2793 farmakológias hatása nem független a csatorna foszforilációs szabályozásától. Ebből az következik, hogy ezek a farmakológiai ágensek vagy a foszforilációs szabályozásban szereplő szerkezeti elemeken keresztül hatnak, vagy hatásmechanizmusuk bizonyos ponton konvergál a foszforilációs szabályozásával és emiatt egymással szorosan összefüggő módon befolyásolják a csatorna kapuzását.

7. Megbeszélés

7.1 Az eredmények értelmezése – a PKC hatására létrejövő TRESK szabályozás mechanizmusának megbeszélése

Az ioncsatorna szabályozás heterológ expressziós rendszerben történő vizsgálatának értékét emeli, ha minél közvetlenebb interakciót sikerül kimutatni a csatorna és annak szabályozó tényezője között. Ez ugyanis azt jelenti, hogy a vizsgált szabályozás majdnem biztosan kialakul az élő szervezetben is mindenhol, ahol a csatorna és a szabályozó faktor egymás mellett jelen van. A TRESK és a kalcineurin interakciója határozottan ebbe a kategóriába tartozik. A TRESK jól definiált kötőhelyeket tartalmaz a szabályozó foszfatáz számára és a kalcineurin *in vitro* is kapcsolódik a csatorna intracelluláris hurok régiójához, harmadik fehérje közreműködése nélkül [144,145]. A kalcineurin emellett *in vitro* defoszforilálja a radioaktív ATP-vel és MARK2 kináz segítségével jelölt TRESK hurok régiót, amennyiben két további feltételt, a kalmodulin szabályozó fehérjét és a megfelelő $[Ca^{2+}]$ -t biztosítjuk [145]. Tekintetbe véve, hogy a kalcineurin és kalmodulin lényegében ubikviter a sejtekben, egyáltalán nem meglepő, hogy a kalcineurin-függő TRESK szabályozás *Xenopus* petesejtekben történt első leírását követően [122], a szabályozást más munkacsoportok is megfigyelték különböző kísérleti rendszerekben. A kalcineurin-függő TRESK aktivációt nemcsak a *Xenopus* rendszerben sikerült másoknak reprodukálni [24,123,126,132,139], hanem minden egyéb vizsgált heterológ rendszerben is működött [138,140], és két munkacsoport megtalálta a csatornát fiziológiásan kifejező hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronokban is [132,138].

Az értekezésben tanulmányozott PKC-függő TRESK aktiváció a kalcineurin hatásánál összetettebb. A PMA hatására lassan kialakuló TRESK aktivációt *Xenopus* petesejtekben leíró első munkacsoport már kizárta a két legegyszerűbb elvi lehetőséget [136]. Egyrészt megállapították, hogy a TRESK csatorna PKC foszforilációs konszenzus szekvenciáinak mutációja nem befolyásolja a PMA hatására jelentkező K^+ áram növekedést. Vagyis a PKC nem közvetlen foszforiláción keresztül szabályozza a TRESK aktivitását. Másrészt alkalmazták a ciklosporin A gátlószert, ami szintén nem védte ki a PMA hatását, tehát levonták a helyes következtetést, hogy a kalcineurin nem vesz részt a

PKC hatásának közvetítésében. Ezek az eredmények sugallták, hogy a PKC hatása közvetett lehet a TRESK csatornára, azonban nem adtak támpontot a továbblépést illetően [136].

Kezdeti méréseink hamar megerősítették, hogy a PKC hatását tényleg nem a kalcineurin közvetíti. Sem a TRESK kalcineurin kötőhelyeinek mutációja, sem a citoplazma $[Ca^{2+}]$ alacsony szinten stabilizálása kelátorral nem befolyásolta a PMA hatására kifejlődő K^+ áram növekedést. Gondolatébresztő eredmény volt viszont, hogy a kalcineurin általi TRESK aktivációt szintén csökkentő szubsztrát szerin mutációk közül az S264A és S264E teljesen kivédte a PMA hatását. Amíg az S264A mutánssal kapcsolatban felmerülhet a kétely, hogy az egy maximálisan (és konstitutívan) aktív mutáns, és azt már esetleg semmilyen szabályozás nem képes tovább aktiválni, addig az S264E inkább gátolt állapotú csatornának felelhet meg, hiszen a negatív töltésű glutamát a foszfoszerint utánozza. Ennek a mutánsnak az egér megfelelőjéről (S276E) egyébként ismerjük, hogy áramát a kalcineurin kb. kétszeresére fokozza [122]. Tehát az S264E nem lehet maximálisan aktív, azonban a PMA mégsem hat rá egyáltalán. Ez arra gondolatra vezetett, hogy a PKC hatása összefüggésben állhat az S264 foszforiláltsági állapotával.

Mivel a PMA hatására és a kalcineurin aktiváció miatt is az S264 defoszforilálódik, a két mechanizmus ugyanabba az aktivált (defoszforilált) állapotba juttatja a csatornát. Mindazonáltal a kalcineurin jóval erőteljesebb S264 defoszforilációt okoz, mint a PMA, hiszen a kalcineurin hatására 2-3 percen belül jobban aktiválódik a TRESK, mint a PMA hatására fél óra alatt. Ezért az várható, hogy a PMA lassú defoszforiláló hatása eltöri a kalcineurinéhoz képest. Ezekkel az elképzelésekkel jó összhangban van az a kísérleti eredmény, hogy a kalcineurin nem hozott létre nagyobb aktivációt a PMA kezelés után, mint amekkorát önmagában előidézett (12. ábra). A kalcineurin mindenképpen defoszforilálta a TRESK csatornák többségét, függetlenül attól, hogy a PMA által létrehozott hatás ennek a munkának egy részét esetleg már előre elvégezte.

A fenti eredmények alapján támadt az az ötletünk, hogy a protein kináz C hatását egy másik kináz koexpressziójával próbáljuk meg kivédeni. Mivel a PKC a S264 lassú defoszforilációját okozza, ezt a hatást ellensúlyozhatjuk egy olyan kinázzal, ami ezt az aminosavat hatékonyan foszforilálja. Munkacsoportunk korábbi eredményéből tudtuk, hogy a S264-et is tartalmazó "szerin klaszter" régiót a MARK2 kináz foszforilálja és a

mutációs analízis alapján minden bizonnyal maga a S264 is szubsztrát [140]. Az egyedüli problémát az jelentette, hogy a MARK2 kinázt a PKC gátolja. A MARK2 egyik legismertebb, sejtpolaritás fenntartásában fontos foszforilációs szabályozását az atípusos PKC izoformák hozzák létre [146]. Ez azonban nem áll szorosabb összefüggésben a kísérleti rendszerünkkel, mivel az atípusos PKC-ra a PMA nem hat, hiszen ismert, hogy az enzim C1 doménja nem köti sem a fiziológias aktivátor diacilglicerint (DAG), sem a forbol-észter PMA-t [166]. A közismert atípusos PKC-s MARK szabályozás mellett azonban egy tanulmányban leírták, hogy a MARK2-t (amit a *Caenorhabditis elegans* feregben történt felfedezéséből adódóan partitioning-defective 1 (PAR-1) néven is említenek) az "új-típusú" (novel-type) PKC is gátolja közvetett mechanizmussal, a protein kináz D enzim közreműködésével [170]. Talán ez, vagy egy hasonló szabályozási útvonal lehetett felelős azért, hogy a vad típusú MARK2 koexpressziója a TRESK csatornával csak kis mértékben csökkentette a PMA aktiváló hatását. Ha viszont a MARK2 hosszú C-terminális szabályozó régióját csonkoltuk, akkor ez a MARK2 Δ konstrukció kifejtette a várt hatást, kivédte a PMA adásra jelentkező TRESK áram növekedést.

A MARK2 Δ konstrukció folyamatosan újrafoszforilálta az S264-et, ezért a PMA hatására jelentkező lassú defoszforiláció nem érvényesülhetett és a csatornák többsége a gátolt állapotában maradt a forbol-észter jelenlétében is (15. ábra). Ha viszont a kalcineurint aktiváltuk, akkor annak erőteljes közvetlen defoszforiláló hatása érvényesült az S264-en a MARK2 Δ jelenlétében is. A kalcineurin gyors defoszforiláló hatását a MARK2 Δ foszforiláló hatása nem tudta az S264-en ellensúlyozni, ezért a csatornák jelentős hányada a defoszforilált állapotban halmozódott fel, és a K⁺ áram aktiválódott. A MARK2 Δ konstrukcióval végzett kísérleteink az S264E mutációtól függetlenül, a vad típusú TRESK felhasználásával megerősítették, hogy a PMA hatása az S264 defoszforilációján keresztül jön létre.

Az S264 defoszforiláció a PMA hatására létrejöhet (kalcineurintól eltérő) foszfataz aktiválásával, vagy az aminosavat foszforiláló kináz gátlásával (vagy mindkettőn keresztül). Ezek közül az S264-et foszforiláló kináz gátlását kísérletesen igazoltuk. A PMA alkalmazása kivédte a kalcineurinnal kiváltott defoszforilációt követően a K⁺ áram visszatérését a nyugalmi állapotba (16. ábra). Mivel ez a visszatérés az S264 foszforilációján alapul, ezért a visszatérés gátlása az S264-et foszforiláló kináz

reakciójának csökkent mértékére utal. A protein kináz C enzimek gyakran gátolnak más kinázokat közvetlen foszforilációval, vagy foszforilációs kaszkádon keresztül (pl. ld. fent a MARK2 esetét), ezért a legvalószínűbbnek azt tartjuk, hogy a lelassult K^+ áram visszatérés háttérében a TRESK csatornát S264-en foszforiláló kináz gátlása áll. Természetesen nem zárhatjuk ki teljesen azt sem, hogy a kináz reakció egyéb okból lassul, pl. a kináz kötődése gátolt a TRESK csatornához, pl. adapter fehérje állapotváltozás vagy fehérje lokalizáció átrendeződés miatt. A PMA esetleges foszfatázokra kifejtett hatását nem vizsgáltuk. Egészen biztos, hogy az S264-et foszforiláló kináz reakció gátlása mellett szükség van foszfatáz aktivitásra is a csatorna aktiválódásához. Ez az aktivitás azonban meglehetősen csekély lehet (pl. a kalcineurinnal összehasonlítva), ha figyelembe vesszük a PMA hatására létrejövő K^+ áram növekedés lassú kinetikáját. Ennek a nagyon kicsi foszfatáz aktivitásnak a lehetséges PMA általi szabályozását nem vizsgáltuk tovább.

A PMA nagyon fontos eszköz a PKC által közvetített hatások vizsgálatában, azonban gyakorta létrehoz a PKC-től független effektusokat és a PKC izoenzimek nem szelektív aktivátora. Emellett a PKC-t a fiziológiástól eltérő módon, irreverzibilisen aktiválja, ami gyakorta olyan fehérjék foszforilációját is előidézi, amelyeket a PKC normális körülmények között nem foszforilálna. Emiatt lényeges, hogy a PMA alkalmazásával nyert eredményeket minden esetben független módon megerősítsük. Munkánkban erre molekuláris biológiai megközelítést, a különböző "új-típusú" (novel-type) PKC izoenzimek koexpresszióját használtuk. A PKC η és PKC ϵ koexpressziója megnyugtató módon kiváltotta ugyanazokat a hatásokat, mint a PMA alkalmazása (17.-19. ábrák). A novel PKC hatására is megnövekedett a TRESK bazális árama és csökkent az ionomycin adása után kialakuló relatív aktiváció (hiszen a csatornák egy része már eleve is defoszforilált aktív állapotban volt). Emellett, a kalcineurin-függő defoszforilációt követően, lelassult az áram visszatérése a nyugalmi állapotba, az S264-et foszforiláló kináz gátlásának megfelelően. A konstitutívan aktív PKC ϵ gátolta az endogén S264-et foszforiláló kinázt a petesejtben, azonban ezt a hatást ellensúlyozni lehetett a PKC-re érzéketlen MARK2 Δ koexpressziójával, ami az S264 fenntartott foszforilációját biztosította (19. ábra).

A fenti funkcionális eredmények teljesen egybehangzók voltak azzal a következtetéssel, hogy a PKC a TRESK csatorna aktivációját a S264 aminosav közvetett defoszforilációján keresztül hozza létre. Azonban emellett szeretnénk volna közvetlen

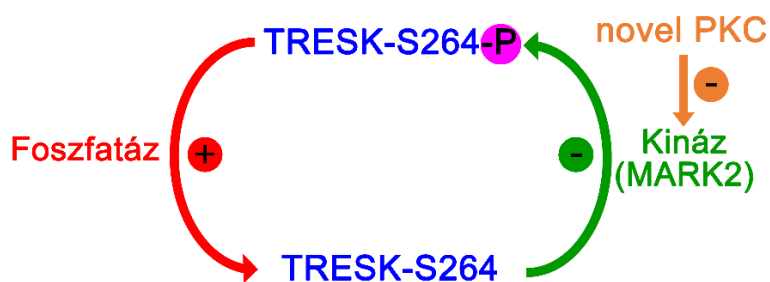
biokémiai módszerrel is igazolni, hogy a csatornafehérje defoszforilációja tényleg létrejön a PMA hatására. Erre a Phos-tag módszert alkalmaztuk, anti-HA immunoblottal kombinálva. Valószínűleg az elsők között használtuk a Phos-tag módszert a csatorna foszforiláció vizsgálatára. A Phos-tag módszer a mi kezünkben rendkívül érzékeny volt a kísérleti protokoll kis eltéréseire (pl. az egyes reagensek életkora is befolyásolta a futtatási képet). Emellett rendkívüli kihívást jelentett a minta előállítása olyan körülmények között, amelyek egyszerre biztosítják a TRESK fehérje preparálás közben fenntartott foszforilációját és a minta kompatibilitását a módszerrel (pl. a klasszikus, foszfát csoportot tartalmazó, foszfatáz-inhibitorok nem használhatók.) Ennek megfelelően a Phos-tag módszer alkalmazása komoly reprodukálhatósági problémákat rejt magában, ami ellen a kísérletekben alkalmazott megfelelő negatív és pozitív kontrollok alkalmazásával és a kísérletek többszöri ismétlésével védekeztünk. Összességében több mint hatszor annyi kísérletet végeztünk, mint amennyit az értekezésemben bemutatok.

A módszer beállításának kezdetén abban reménykedtünk, hogy a Phos-tag SDS-PAGE eredmények nagy felbontású képet szolgáltatnak majd a TRESK fehérje foszforilációjáról. A gyártó leírása szerint ugyanis a fehérje mobilitás a Phos-tag gélen nemcsak a foszforilációk számától, hanem azok környezetétől is függ, tehát pl. a különböző pozíciókban egyszeresen foszforilált fehérjék nem migrálnak feltétlenül ugyanoda a gélen. Ezeket a reményeket azonban szertefoszlatta az a felismerés, hogy a módszer a foszforilált fehérjéket sokkal kisebb határfokkal jeleníti meg, mint a defoszforilált változatot. A foszforilált TRESK fehérjék lényegében alig ábrázolódnak a Phos-tag módszerrel, csak a legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponensek láthatók egy-egy halvány (esetenként bizonytalan) csík formájában. A foszforilált fehérjék alacsony detektálási határfokára többféle magyarázat is elképzelhető, de talán az a legvalószínűbb, hogy a módszer a foszforilált fehérjéket "szétteríti" futtatás közben a gélben, ezért azok nem futnak egy éles csíkba.

Ennek megfelelően a továbbiakban a megközelítésünket elsősorban a jól ábrázolódó defoszforilált komponensre alapoztuk, ennek mennyiségét hasonlítottuk a TRESK összfehérje (foszforilált+defoszforilált) mennyiséghez, amit ugyanabból a mintából hagyományos futtatást követő Western blottal határoztunk meg. A humán TRESK csatorna 26 szerin, treonin vagy tirozin aminosavat tartalmaz az intracelluláris

régióiban, ami meglehetősen nagy lehetséges komplexitást jelent a foszforilációk tekintetében. A lehetséges foszforilációs kombinációk nagy számának ellenére, a sejtek kezelése PMA-val jól értékelhető módon megváltoztatta a TRESK fehérje vándorlási mintázatát a gélben, és egyértelműen a defoszforilált változat felhalmozódását eredményezte, ami az alsó csík intenzitásának növekedésében nyilvánult meg (20. ábra). Elmondhatjuk tehát, hogy sikerült igazolnunk a PMA kezelés hatására létrejövő TRESK defoszforilációt a Phos-tag módszer alkalmazásával.

Összefoglalva tehát, a kísérleti eredményeink legvalószínűbb interpretációja a következő. Az "új-típusú" (novel-type) PKC gátolja a kinázt, ami a TRESK csatornát nyugalmi körülmények között az S262-267 "szerin klaszter" területén foszforilálja. Ezután a csatornát lassan defoszforilálja a citoplazma (kalcineurintól eltérő) gyenge foszfatáz aktivitása és ennek megfelelően a TRESK áram aktiválódik (22. ábra).



22. ábra: A protein kináz C hatására létrejövő TRESK aktiváció mechanizmusa.

A TRESK csatornát aktiválja a S264 aminosav defoszforilációja, illetve ennek megfelelően a S264 foszforiláció csökkenti a csatorna aktivitást. Az "új-típusú" protein kináz C (*novel PKC*) gátolja a kináz aktivitást, ami a TRESK foszforilációért felelős ezen a szabályozási ponton (vagyis a PKC gátlóoldással aktiválja a csatornát). A TRESK-et gátló kináz gátlását követően a csatornát lassan defoszforilálja egy gyenge foszfatáz aktivitás, ami egyértelműen különbözik a gyors kalcium-függő, kalcineurin által létrehozott csatorna aktivációtól. Kísérleti körülmények között a mikrotubulus-affinitás reguláló kinázt (MARK2) használhatjuk a S264 foszforilációjára, azonban *in vivo* más (még ismeretlen) kinázok is foszforilálhatják ezt a régiót.

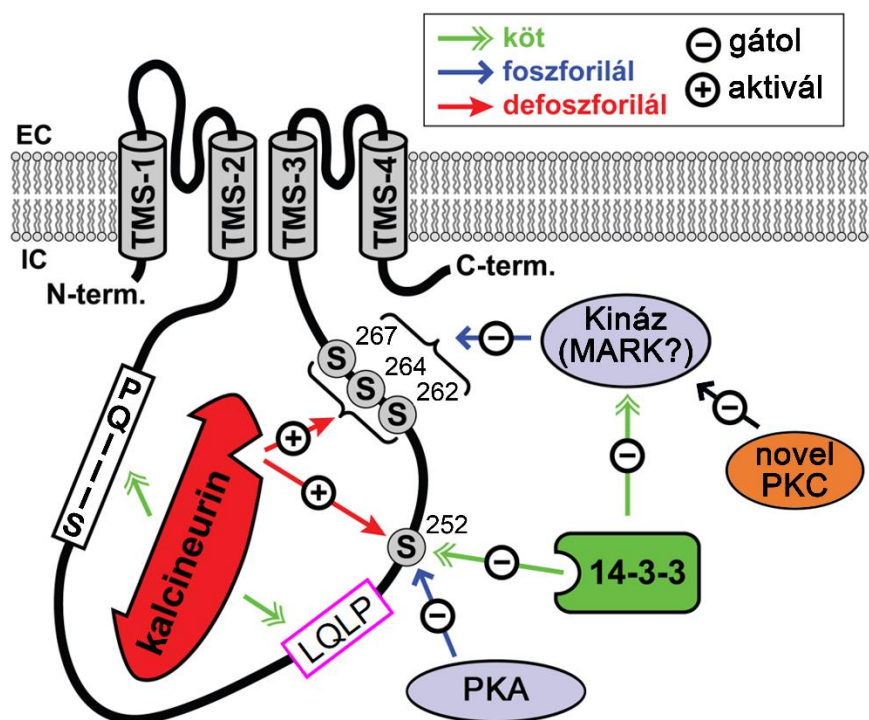
Eredményeink elsőként világítanak rá a novel PKC által létrehozott TRESK aktiváció mechanizmusára és megmagyarázzák a PMA, *Xenopus* petesejt expressziós rendszerben tapasztalható, csatornára kifejtett farmakológias hatását. A TRESK kalcium-függő szabályozása a kalcineurinon keresztül közvetlenebb mechanizmusnak felel meg, mint a PKC által kifejtett hatás. Mindkét mechanizmus az S262-267 "szerin klaszter" defoszforilációját eredményezi, azonban a kalcineurin általában véve defoszforilálja a TRESK csatornát, mivel ez a lényegében ubikviter foszfatáz közvetlenül kötődik a csatornához magas affinitással. Ezzel szemben a PKC hatása függ egy közbenső lépéstől,

a TRESK-et foszforiláló szabályozó kináztól, ami különböző lehet az egyes sejttípusokban. A MARK1-MARK3 kinázok foszforilálják a "szerin klaszter" kísérleti körülmények között és kifejeződnek a hátsó gyöki ganglionban [114], azonban elképzelhető, hogy más kinázok is hozzájárulnak e fontos szabályozó régió foszforilációjához. Jelenleg nem ismert(ek) pontosan a TRESK-et a "szerin klaszter" területén foszforiláló endogén kináz(ok) sem a *Xenopus* petesejt heterológ expressziós rendszerben, sem a TRESK csatorna fiziológias előfordulási helyén, a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok szenzoros neuronjaiban. Tudjuk viszont, hogy a *Xenopus* petesejtben az "új-típusú" PKC gátolja ez(ek)e(t) az endogén kináz(oka)t. Ha a szenzoros neuronban is hasonló kinázok játszanak szerepet a TRESK szabályozó régiójának foszforilációjában, akkor az "új-típusú" PKC aktivitás befolyásolhatja az ingerlékenységet ezekben a sejtekben a TRESK csatorna szabályozásán keresztül.

7.2 A PKC általi TRESK szabályozás lehetséges élettani szerepe

A TRESK csatornára az intracelluláris szabályozó mechanizmusok összetett módon hatnak. Ezeknek a szabályozó mechanizmusoknak a felderítésében a munkacsoportunk vezető szerepet játszott és az eddig ismert rendszert az értekezésben bemutatott eredmények alapján újabb elemmel egészíthetjük ki, az "új-típusú" novel PKC által létrehozott TRESK szabályozással (23. ábra).

Az értekezésben bemutatott adatok alapján biztosra vehető, hogy *Xenopus* petesejtben a PKC η és PKC ϵ jelentős mértékben aktiválja a humán TRESK csatorna áramát. A *Xenopus* expressziós rendszerben meghatároztuk a PKC-függő TRESK aktiváció mechanizmusát, azonban eredményül azt kaptuk, hogy a mechanizmus támaszkodik a heterológ rendszer egyik endogén komponensére, a TRESK-et S264-es pozícióban foszforiláló kinázra, amit ezidáig még pontosan nem azonosítottak.



23. ábra: A humán TRESK foszforiláció-függő szabályozásában résztvevő tényezők.

A humán TRESK csatornát a S262-267 “szerin klaszter” régió defoszforilációja serkenti, amit kiegészíthet az S252 defoszforiláció járulékos aktiváló hatása. A csatorna PQIIS régiójához közvetlenül kötődő calcineurin aktiválódását követően kihorgonyozódik az LQLP régióhoz is és defoszforilálja ezeket a szabályozó szerineket. A csatorna gátlásáért kinázok felelősek, a S262-267 régiót a MARK vagy más még nem azonosított kinázok foszforilálják, az S252 pedig a protein kináz A (PKA) szubsztrátja. A foszforilált S252-höz kapcsolódik a 14-3-3 adapter fehérje, ami hozzájárulhat a csatorna gátlásához. A 14-3-3 másik erőteljesen megnyilvánuló hatása, hogy gátolja a S262-267 “szerin klaszter” foszforiláló kinázt. Az értekezésem legfontosabb eredménye, hogy az “új-típusú” (novel) PKC is ezt a kinázt gátolja és a TRESK csökkent foszforilációján keresztül okoz csatorna aktivitás fokozódást.

A PKC η aránylag alacsony expressziót mutat hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronokban mRNS szinten [114]. A PKC ϵ viszont nagy mennyiségben jelen van és jól ismert módon hozzájárul a gyulladáshoz, neuropátiás és rosszindulatú daganatok okozta fájdalom kialakulásához a DRG és trigeminális ganglion (TRG) primer szenzoros neuronokban [173-177]. Több oldalról megerősített adatok szerint a PKC ϵ aktivitás fokozódik az állatkísérletes fájdalom modellekben és az aktivált PKC ϵ hozzájárul a hiperalgéria és krónikus fájdalom kialakulásához. Leírták a PKC ϵ közvetlen csatorna hatását is, a PKC ϵ foszforilálja a tranziens-receptor-potenciál vanilloid-receptor 1 (TRPV1) nem-szelektív kationcsatornát és ennek aktivációjával is hozzájárul a nociceptív neuronok fokozott ingerlékenységéhez [177,178].

Mindemellett a PKC ϵ központi szereplője a krónikus nociceptor érzékenyítés (nociceptor priming) mechanizmusának (ld. a vonatkozó könyvfejezetet [179]). Ezt a jelenséget állatkísérletes modellekben az akut és krónikus fájdalomban szerepet játszó mechanizmusok elkülönített vizsgálatára is használják. Egy ilyen tipikus modell kísérletben először a patkány hátsó talpában karragén injekcióval gyulladáshoz vezető jellegű fájdalmat hoznak létre. Az ennek hatására jelentkező hiperalgéria átmeneti, általában lecseng négy napon belül. Érdekes módon viszont, ennek a hiperalgériának a lecsengése után ugyanoda beinjekciózott prosztaglandin E₂-re (PGE₂) újra hiperalgéria jelentkezik legalább 24 órán keresztül, de néha akár hetekig is fennálló módon. A karragén injekcióval korábban nem érzékenyített állatokban ugyanilyen PGE₂ injekció nem okoz hiperalgériát, vagy a hiperalgéria néhány órán belül megszűnik. A hosszútávú érzékenyítő hatás a PKC ϵ fokozott aktivitásán alapul. Az érzékenyítés a PKC ϵ gátlásával kivédhető [174,180], illetve a PKC ϵ kísérletes aktiválásával karragén injekció nélkül is kiváltható [181]. Elenyésző kisebbségben, de valószínűleg nem jelentéktelenül, egyes fájdalom modellekben leírták a PKC ϵ csökkent aktivitását is, mint pl. a fájdalomkutatásban szintén széles körben használt krónikus idegkompressziós sérülés (chronic nerve constriction injury) esetén [182]. (Ez a vizsgálat is megerősítette a karragén vagy komplett Freund-adjuváns injekcióval kiváltott PKC ϵ aktiválódást, a krónikus idegkonstrikció esetén leírt PKC ϵ gátló hatástól eltérően.)

A vonatkozó irodalom törtrészének megfelelő fenti adatok is jól illusztrálják, hogy a PKC ϵ a fájdalom kialakulásának jelentős szabályozója a primer nociceptor neuronokban. Ha az általunk *Xenopus* petesejtben leírt PKC ϵ -függő TRESK szabályozás létrejön humán nociceptor neuronokban is, akkor az hozzájárulhat a hiperalgéria mérsékléséhez gyulladáshoz vezető fájdalomban, vagyis fékként működhet. A PKC ϵ hatására megnövekedő TRESK áram a szenzoros neuron hiperpolarizációját hozza létre és ezzel annak ingerlékenységét csökkenti. Emellett érdekes lehetőség, hogy a krónikus nociceptor érzékenyítés (priming) folyamatában szerepet játszhat az érzékenyítést létrehozó stimulus adását követő hiperalgéria mérséklődésben, vagyis abban, hogy az érzékenyítő inger hatására csak átmeneti hiperalgéria jelentkezik. Mindemellett, a krónikus idegkonstrikciós modellben hozzájárulhat akár a fokozott ingerlékenység kialakulásához is, hiszen a csökkent PKC ϵ aktivitás a TRESK gátláson keresztül depolarizálja a neuront. Természetesen az ebben a bekezdésben írt állításokat

spekulációnak tekintjük és nem megalapozott következtetéseknek, hiszen a kérdések még számos további vizsgálatot igényelnek. Ezeket a vizsgálatokat jelentősen nehezítheti, hogy a rágcsáló állatkísérletes modellekben a PKC ϵ hatása kevésbé számottevő lehet, hiszen az egér TRESK csatornán a szignifikáns hatás kimutatása a *Xenopus* rendszer optimális körülményei között is kihívást jelentett.

7.3 A TRESK farmakológiai befolyásolására tett kísérletek

A TRESK csatorna szenzoros neuron ingerlékenység szabályozásában betöltött szerepéről és jelentőségéről mind a mai napig megoszlanak a vélemények. Számos tényező járul ehhez hozzá. A TRESK génhiányos egérhez több mint egy évtizedig nem sikerült meggyőző fenotípust rendelni [125,149]. A 2010-ben leírt migrént okozó TRESK kereteltolódásos (frameshift) mutációhoz [126] hasonlót néhány hónappal ezelőttig senki nem közölt az intenzív vizsgálatok ellenére [139,150,183-185]. Napjainkban látszik úgy, hogy elértük a fordulópontot ezekben a kérdésekben. Két független tanulmány egyértelmű funkcionális különbségeket talált a vad típusú és TRESK génhiányos egér között (ld. a Bevezetés 3.2.5 fejezetét, [154,155]). Emellett sikerült olyan független TRESK kereteltolódásos mutációt azonosítani, ami szintén migrénnel együtt fordult elő [24]. Ez a munkacsoport ugyan a kereteltolódásos mutáció miatt fellépő alternatív transzláció iniciációval keletkező kóros TRESK fehérjedarab TREK csatornákra kifejtett domináns-negatív hatásával magyarázta a fokozott ingerlékenység és migrén kialakulását [24], azonban nagyon kérdéses, hogy ez az álláspont tartható lesz-e az egerekben leírt, TRESK hiányában megjelenő jelentős funkcionális eltérések ismeretében [154,155]. Habár önmagában nem bizonyító erejű, a közelmúltban egy dél-koreai munkacsoport közölt egy klinikai esetet, ahol a familiáris migrénben szenvedő szellemileg visszamaradott betegükben új generációs szekvenálással (next generation sequencing, NGS) a TRESK W101R misszensz mutációját azonosították, mint valószínű genetikai oki tényezőt [186]. A mutáció a migrénes anyában és idősebb nővérben is kimutatható volt. Ez alapján úgy tűnik, hogy nemcsak kereteltolódásos mutáció okozhatja migrén megjelenését, hanem misszensz eltérés is.

Kétségtelenül hozzájárult a TRESK szerepének bizonytalan megítéléséhez a csatornára specifikus gátlószer hiánya. Egy ilyen gátlószer jól használható lett volna állatkísérletes modellekben a TRESK akut gátlására és az ennek hatására fellépő funkcionális következmények vizsgálatára. Azonban mind a mai napig ilyen nem áll rendelkezésre, ezért a (többnyire izolált sejteken végzett) vizsgálatokban különböző kevésbé specifikus ágenseket használtak, mint pl. a lamotrigin vagy az IBA (ld. a Bevezetés 3.2.6 fejezetét).

Munkacsoportunk kollaborációs partnerével együttműködve a cloxyquin TRESK-aktiváló ágens kémiai módosításával létrehozott 28 származékot. A 28 vegyület közül egyik sem hatott a TRESK áramra lényegesen alacsonyabb koncentrációban, mint a kiindulási cloxyquin, azonban a származékok jelentős hányada (11 a 28-ból), a cloxyquin aktiváló hatásával ellentétben, gátolta a TRESK áramot. Az A2764 valamivel kevésbé volt potens gátlószere a TRESK-nek ($IC_{50}=11.8 \mu M$), mint az A2793 ($IC_{50}=6.8 \mu M$, mindkét félmaximális gátló koncentráció a calcineurin által aktivált egér TRESK csatornára vonatkozik). Az A2764 azonban kedvezőbb szelektivitási profilt mutatott az összes egér K_{2P} csatornán vizsgálva, mint az A2793. Az A2764 gátlószer 100 μM -os koncentrációban nem gátolta a TRESK-en kívül egyik K_{2P} csatorna áramát sem 20 %-nál jobban. Ezzel szemben az A2793, a TRESK mellett, a TASK-1 csatornát is jelentősen gátolta, 100 μM -os koncentrációban kb. 50 %-ban.

Az A2764 (100 μM) egérből izolált hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronok szinte mindegyikében depolarizációt hozott létre, és az akciós potenciál kialakulására vonatkozó reobázist csökkentette. Ezeknek a hatásoknak egyike sem fejlődött ki azonban a TRESK génhiányos állatból izolált sejteken. Ez azt mutatja, hogy a vad típusú állatban a TRESK jelentős mértékben hozzájárul a DRG neuron nyugalmi membránpotenciáljának és ingerlékenységének kialakításához, ami a csatorna akut gátlásakor nyilvánvalóvá válik. Ez a TRESK DRG neuronokban betöltött jelentős szerepét támasztja alá, még akkor is, ha a TRESK génhiányos állat funkcionális tesztekkel kevésbé tér el a vad típustól, a krónikus TRESK hiány miatt fellépő kompenzatórikus (egyéb csatornákat érintő) K^+ áram növekedés miatt [154]. (Az utóbbi két bekezdésben a dr. Lengyel Miklós PhD értekezésében szereplő adatokat is diszkutáltam.)

Az értekezésemben bemutatott nem publikált eredmény jól szemlélteti, hogy az A2793 cloxyquin származék a humán TRESK csatorna állapot-függő gátlását okozza (21.

ábra). Az A2793 nemcsak a hatás irányában különbözik a szerkezetileg hasonló cloxyquintól, hanem az állapot-függésük jellege is eltérő. A cloxyquin a nyugalmi állapotú, foszforilált TRESK csatornára hat jobban (aktiválja), ezzel szemben az A2793 a kalcineurin hatására aktiválódott (defoszforilált állapotnak megfelelő) K^+ áramot gátolja sokkal kifejezettebben. Az ellenkező foszforiláltsági állapotban a két farmakológiai ágens hatása egyaránt elhanyagolható. Az A2793-mal humán TRESK csatornán kapott eredmények tehát azt mutatják, hogy a hatás iránya (gátol vagy aktivál) és az állapot-függés jellege (a foszforilált vagy defoszforilált csatornán hat jobban) kapcsolt módon változik a kémiai módosítás hatására.

Ez azt a benyomást kelti, mintha a TRESK csatorna aktivitása egy fix tartományban változhatna csak a nagyon különböző szabályozó tényezők hatására. Valószínű, hogy az intracelluláris hurok régió foszforilációja és a membránfázisban koncentrálnódó hidrofób karakterű farmakonok eltérő támadásponttal hatnak a csatorna szerkezetben. Ennek ellenére, ha a defoszforiláció hatására a csatorna eléri az aktivitási tartomány fix felső határát, akkor innen tovább aktiválni gyakorlatilag nem lehet (cloxyquinnel) farmakológiai módon sem. Az A2793 50 μM -os koncentrációját használva a csatornaaktivitás alsó tartományában is hasonló jelenség adódik, a foszforilált csatornát a gátlószer sem képes tovább gátolni. Ilyen jellegű viselkedés várható például, ha a csatorna kapuzását egyféle, sztereotip és nem plasztikus mechanizmus irányítja, ami a nyitási valószínűség tekintetében alsó és felső korlátot jelent, és minden szabályozó tényező csak ezen a mechanizmuson keresztül tudja a csatorna aktivitást befolyásolni [187].

Tudjuk azt, hogy az alsó korlát áttörhető farmakológiai eszközökkel. A Ba^{2+} magas koncentrációban nyilván gátolja a nyugalmi állapotú, foszforilált TRESK csatorna áramot is [121]. Azonban a Ba^{2+} a csatornapórus eltömeszelésével hat és minden bizonnyal elsősorban nem a kapuzást befolyásolja. Hasonlóan gátolható a TRESK nyugalmi árama Hg^{2+} (1 μM) adásával [135], ami talán nem a pórusba köt, hanem a normál kapuzástól független szerkezeti torzulást okoz. Vagyis a kapuzástól függetlenül tönkre lehet tenni a csatornaműködést, ami az áram megszűnésével jár. (Erre valószínűleg az A2793 nagyobb koncentrációja is alkalmas lenne.)

Ennél azonban érdekesebb kérdés, hogy a felső korlát áttörhető-e, vagyis létezik-e a TRESK "szuperaktivátora". Ezesetben olyan farmakológiai ágensről beszélünk, ami

a kalcineurinnal aktivált, defoszforilált TRESK csatorna áramát többszörösére fokozza. Tudomásunk szerint jelenleg ilyen nem ismert. Ha valakinek sikerülne ilyet találni, akkor ezzel a TRESK áramát fokozni lehetne a csatorna, intakt állatban kevésbé ismert, foszforilációs állapotától függetlenül.

8. Következtetések

1. A PMA által TRESK csatornára kifejtett aktiváló hatás nem a kalcium/kalmodulin-függő protein foszfatáz kalcineurin közvetítésével jön létre. Viszont a PMA hatása a TRESK csatorna intracelluláris hurok régiójában található, csatorna aktivitás szabályozásában meghatározó szerin 264 defoszforilációján alapul, ami egyben a kalcineurinnak is szubsztrátja.
2. Az "új-típusú" (novel-type) protein kináz C epsilon (ϵ) és eta (η) izoformák aktiválják a humán TRESK csatornát a *Xenopus laevis* heterológ expressziós rendszerben. A protein kináz C farmakológias aktiválása forbol-mirisztil-acetát (PMA) hatására és a PKC ϵ (vagy PKC η) koexpressziója hasonlóan befolyásolja a TRESK aktivitást, illetve a csatorna kalcium-függő szabályozását.
3. A protein kináz C úgy eredményezi a TRESK defoszforilációját, hogy gátolja azt az endogén kinázt, ami a szerin 264 aminosavat foszforilálja. A szerin 264-et foszforiláló kináz aktivitásának hiányában a csatorna lassan (30-60 perc alatt) defoszforilálódik és a TRESK K⁺ áram megnő.
4. A mikrotubulus-affinitás-reguláló kináz 2 (MARK2) foszforilálja a TRESK csatornában a szerin 264 aminosavat és ennek megfelelően a MARK2 csonkolt változata kivédi az "új-típusú" PKC hatását.
5. A PMA a humán és az egér TRESK csatornát is aktiválja, azonban az egér csatornára kifejtett hatás sokkal kisebb mértékű.
6. A cloxyquin kémiai módosításával szintetizált A2793 vegyület gátolja a humán TRESK áramot. A hatás állapot-függő, az A2793 kifejezetten gátolja a kalcineurin által defoszforilált és aktív csatornát, de a foszforilált és kis aktivitású csatornát alig befolyásolja nyugalmi körülmények között.

9. Összefoglalás

A TRESK háttér K^+ csatorna a primer szenzoros neuronok ingerlékenységének alapvető meghatározója. Jelentős mennyiségben kifejeződik a hátsó gyöki és trigeminális ganglion nociceptív neuronokban és TRESK-hiányos állatmodellben a feji területen fokozott érzékenység jelentkezik fájdalmas hő, mechanikai és kémiai ingerekre. Emberben a TRESK egyes mutációi a familiáris migrén ritka formáját okozzák. A TRESK csatornát, a K_{2P} csatorna családon belül egyedülálló módon, a citoplazma kalcium koncentráció növekedése aktiválja. A kalcium/kalmodulin-függő foszfatáz kalcineurin defoszforilálja a csatorna intracelluláris hurok régiójában található szerin aminosavakat és ennek hatására megnő a K^+ áram. A kalcineurin közvetlenül kötődik két jól definiált aminosav szekvencia motívumhoz a hurok régióban.

A humán TRESK csatornát aktiválja a protein kináz C aktivátor forbol-mirisztilacetát (PMA) *Xenopus* petesejtekben. A protein kináz C epsilon (ϵ) és eta (η) izoformák koexpressziója a TRESK csatornával hasonló hatást okoz, mint a PMA adása. A PMA hatását nem a kalcineurin közvetíti, pl. a kalcineurin kötőhelyek mutációja nem védi ki a K^+ áram növekedést. A kalcineurin célpont szerin 264 mutációja a TRESK csatornában viszont megakadályozza a PMA áram növelő hatását. A S264 fenntartott foszforilációja, amit a mikrotubulus-affinitás-reguláló kináz 2 csonkolt változatával (MARK2 Δ) hozhatunk létre, megszünteti a PKC-függő TRESK aktivációt. Ez azt mutatja, hogy a kalcineurinon kívül, a PKC is a S264 foszforiláltsági állapotának változtatásán keresztül szabályozza a TRESK áramot. A PMA adása vagy a PKC koexpressziója lelassította a K^+ áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcineurin-függő defoszforilációt követően. Ennek megfelelően a TRESK aktiváció legvalószínűbb mechanizmusa, hogy a PKC gátolja azt a kinázt, ami a S264 (re)foszforilációjáért felelős. A PKC hatására kialakuló TRESK fehérje defoszforilációt közvetlenül is kimutattuk, Phos-tag™ SDS-PAGE módszer alkalmazásával. Összefoglalva tehát az "új-típusú" (novel-type) PKC aktiválódása a TRESK szerin 264 lassú, közvetett defoszforilációját eredményezi, a kalcineurintól független mechanizmussal. A PKC hatására aktiválódó TRESK áramnak jelentősége lehet az ingerlékenység szabályozásában a nociceptív szenzoros neuronokban, amelyekben a PKC ϵ a fájdalmas ingerekre létrejövő válasz időbeli lefolyását változtatja.

10. Summary

TRESK background K^+ channel is a major determinant of the excitability of primary sensory neurons. It is abundantly expressed in the dorsal root and trigeminal ganglion nociceptive neurons, and in TRESK-deficient animal models, the sensitivity to painful thermal, mechanical and chemical stimuli is increased. Certain TRESK mutations cause a rare form of familial migraine. It is unique in the K_{2P} channel family that TRESK is activated by cytoplasmic calcium. The calcium/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin dephosphorylates the serine residues in the intracellular loop of the channel, and results in the increase of the K^+ current. Calcineurin directly binds to two well-defined amino acid sequence motifs in the intracellular loop region of TRESK.

Human TRESK is activated by the protein kinase C activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in *Xenopus* oocytes. The coexpression of protein kinase C ϵ and η isoforms with TRESK evokes a similar effect to that of PMA. The effect of the phorbol is not mediated by calcineurin, e.g. the mutation of the calcineurin-binding sites in TRESK did not influence the PMA-induced increase of the K^+ current. In sharp contrast, the mutation of the target residue serine 264 of calcineurin prevented the effect of PMA. The sustained phosphorylation of S264, induced by the coexpression of the truncated version of microtubule-affinity-regulating kinase 2 (MARK2 Δ), also abolished the PKC-dependent TRESK activation. This indicates that, in addition to calcineurin, PKC also regulates TRESK by changing the phosphorylation status of S264. The administration of PMA or the coexpression of PKC slowed the recovery of the K^+ current to the resting state after the calcineurin-dependent dephosphorylation of TRESK. Accordingly, the probable mechanism for TRESK activation by PMA is the PKC-dependent inhibition of the kinase (re)phosphorylating S264 in the channel. The PKC-induced dephosphorylation of TRESK protein was also directly detected by the Phos-tagTM SDS-PAGE method. In summary, the activation of novel-type PKC results in the slow (indirect) dephosphorylation of TRESK at the regulatory residue S264 in a calcineurin-independent manner. The PKC-dependent activation of TRESK current may contribute to the regulation of excitability in the nociceptive sensory neurons, where PKC ϵ modifies the time course of the response to painful stimuli.

11. Irodalomjegyzék

1. Enyedi, P., and Czirják, G. (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 90: 559-605
2. Gada, K., and Plant, L. D. (2018) K2P channels: Emerging targets for novel analgesic drugs. *Br J Pharmacol.* 176: 256-266
3. Renigunta, V., Schlichthorl, G., and Daut, J. (2015) Much more than a leak: structure and function of K(2)p-channels. *Pflugers Arch.* 467: 867-894
4. Dong, Y. Y., Pike, A. C., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., Ruda, G. F., Clausen, M. V., Cao, L., Brennan, P. E., Burgess-Brown, N. A., Sansom, M. S., Tucker, S. J., and Carpenter, E. P. (2015) K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science.* 347: 1256-1259
5. Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., and Goldstein, S. A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature.* 376: 690-695
6. Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and 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
7. Kunkel, M. T., Johnstone, D. B., Thomas, J. H., and Salkoff, L. (2000) Mutants of a temperature-sensitive two-P domain potassium channel. *J Neurosci.* 20: 7517-7524
8. Goldstein, S. A., Price, L. A., Rosenthal, D. N., and Pausch, M. H. (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
9. Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T., and 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
10. Czirják, G., and 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

11. Turner, P. J., and Buckler, K. J. (2013) Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J. Physiol.* 591: 5977-5998
12. Buckler, K. J. (2015) TASK channels in arterial chemoreceptors and their role in oxygen and acid sensing. *Pflugers Arch.* 467: 1013-1025
13. Kim, D., Cavanaugh, E. J., Kim, I., and Carroll, J. L. (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
14. Berg, A. P., Talley, E. M., Manger, J. P., and Bayliss, D. A. (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
15. Larkman, P. M., and Perkins, E. M. (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
16. Lazarenko, R. M., Willcox, S. C., Shu, S., Berg, A. P., Jevtovic-Todorovic, V., Talley, E. M., Chen, X., and Bayliss, D. A. (2010) Motoneuronal TASK channels contribute to immobilizing effects of inhalational general anesthetics. *J Neurosci.* 30: 7691-7704
17. Blin, S., Chatelain, F. C., Feliciangeli, S., Kang, D., Lesage, F., and 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
18. Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E. J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., and 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
19. Levitz, J., Royal, P., Comoglio, Y., Wdziekonski, B., Schaub, S., Clemens, D. M., Isacoff, E. Y., and 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
20. Lengyel, M., Czirjak, G., and Enyedi, P. (2016) Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J Biol Chem.* 291: 13649-13661

21. Hwang, E. M., Kim, E., Yarishkin, O., Woo, D. H., Han, K. S., Park, N., Bae, Y., Woo, J., Kim, D., Park, M., Lee, C. J., and Park, J. Y. (2014) A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat Commun.* 5: 3227
22. Cho, C. H., Hwang, E. M., and Park, J. Y. (2017) Emerging Roles of TWIK-1 Heterodimerization in the Brain. *Int J Mol Sci.* 19
23. Choi, J. H., Yarishkin, O., Kim, E., Bae, Y., Kim, A., Kim, S. C., Ryoo, K., Cho, C. H., Hwang, E. M., and Park, J. Y. (2018) TWIK-1/TASK-3 heterodimeric channels contribute to the neurotensin-mediated excitation of hippocampal dentate gyrus granule cells. *Exp Mol Med.* 50: 145
24. Royal, P., Andres-Bilbe, A., Avalos Prado, P., Verkest, C., Wdziekonski, B., Schaub, S., Baron, A., Lesage, F., Gasull, X., Levitz, J., and Sandoz, G. (2019) Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK. *Neuron.* 101: 232-245 e236
25. Cowles, C. L., Wu, Y. Y., Barnett, S. D., Lee, M. T., Burkin, H. R., and Buxton, I. L. (2015) Alternatively Spliced Human TREK-1 Variants Alter TREK-1 Channel Function and Localization. *Biol Reprod.* 93: 122
26. Rinne, S., Renigunta, V., Schlichthorl, G., Zuzarte, M., Bittner, S., Meuth, S. G., Decher, N., Daut, J., and Preisig-Muller, R. (2014) A splice variant of the two-pore domain potassium channel TREK-1 with only one pore domain reduces the surface expression of full-length TREK-1 channels. *Pflugers Arch.* 466: 1559-1570
27. Veale, E. L., Rees, K. A., Mathie, A., and Trapp, S. (2010) Dominant negative effects of a non-conducting TREK1 splice variant expressed in brain. *J Biol Chem.* 285: 29295-29304
28. Mirkovic, K., and Wickman, K. (2011) Identification and characterization of alternative splice variants of the mouse *Trek2/Kcnk10* gene. *Neuroscience.* 194: 11-18
29. Thomas, D., Plant, L. D., Wilkens, C. M., McCrossan, Z. A., and Goldstein, S. A. (2008) Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron.* 58: 859-870

30. Simkin, D., Cavanaugh, E. J., and 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
31. Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* 15: 6854-6862
32. Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* 15: 1004-1011
33. Lopes, C. M., Gallagher, P. G., Buck, M. E., Butler, M. H., and Goldstein, S. A. (2000) Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J Biol Chem.* 275: 16969-16978
34. Patel, A. J., Maingret, F., Magnone, V., Fosset, M., Lazdunski, M., and Honore, E. (2000) TWIK-2, an inactivating 2P domain K⁺ channel. *J Biol Chem.* 275: 28722-28730
35. Bockenhauer, D., Zilberberg, N., and Goldstein, S. A. (2001) KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nat Neurosci.* 4: 486-491
36. Ben Soussia, I., El Mouridi, S., Kang, D., Leclercq-Blondel, A., Khoubza, L., Tardy, P., Zariohi, N., Gendrel, M., Lesage, F., Kim, E. J., Bichet, D., Andrini, O., and Boulin, T. (2019) Mutation of a single residue promotes gating of vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels. *Nat Commun.* 10: 787
37. Kang, D., Choe, C., Cavanaugh, E., and Kim, D. (2007) Properties of single two-pore domain TREK-2 channels expressed in mammalian cells. *J Physiol.* 583: 57-69
38. Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464-5471
39. Cid, L. P., Roa-Rojas, H. A., Niemeyer, M. I., Gonzalez, W., Araki, M., Araki, K., and Sepulveda, F. V. (2013) TASK-2: a K2P K(+) channel with complex regulation and diverse physiological functions. *Front Physiol.* 4: 198

40. Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin, L. G., Preisig-Muller, R., Daut, J., Karschin, A., and Derst, C. (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem.* 275: 16650-16657
41. Kang, D., Choe, C., and Kim, D. (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.* 564: 103-116
42. Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., Eschalier, A., Lazdunski, M., and Noel, J. (2014) Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain.* 155: 2534-2544
43. Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., and 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
44. Lolicato, M., Riegelhaupt, P. M., Arrigoni, C., Clark, K. A., and Minor, D. L., Jr. (2014) Transmembrane helix straightening and buckling underlies activation of mechanosensitive and thermosensitive K(2P) channels. *Neuron.* 84: 1198-1212
45. Brohawn, S. G., Su, Z., and 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
46. Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B. L., Tucker, S. J., Rapedius, M., and Baukrowitz, T. (2016) A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell.* 164: 937-949
47. Rinne, S., Kiper, A. K., Vowinkel, K. S., Ramirez, D., Schewe, M., Bedoya, M., Aser, D., Gensler, I., Netter, M. F., Stansfeld, P. J., Baukrowitz, T., Gonzalez, W., and Decher, N. (2019) The molecular basis for an allosteric inhibition of K(+)-flux gating in K2P channels. *Elife.* 8: e39476
48. Honore, E., Maingret, F., Lazdunski, M., and Patel, A. J. (2002) An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. *EMBO J.* 21: 2968-2976

49. Kim, Y., Gnatenco, C., Bang, H., and Kim, D. (2001) Localization of TREK-2 K⁺ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. *Pflugers Arch.* 442: 952-960
50. Kim, Y., Bang, H., Gnatenco, C., and 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. *Pflugers Arch.* 442: 64-72
51. Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Pena-Munzenmayer, G., and Sepulveda, F. V. (2010) Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J Biol Chem.* 285: 16467-16475
52. Brohawn, S. G. (2015) How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann N Y Acad Sci.* 1352: 20-32
53. Berrier, C., Pozza, A., de Lacroix de Lavalette, A., Chardonnet, S., Mesneau, A., Jaxel, C., le Maire, M., and Ghazi, A. (2013) The purified mechanosensitive channel TREK-1 is directly sensitive to membrane tension. *J Biol Chem.* 288: 27307-27314
54. Lauritzen, I., Chemin, J., Honore, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M., and Jane Patel, A. (2005) Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep.* 6: 642-648
55. Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., and Lazdunski, M. (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* 17: 3297-3308
56. Lesage, F., Maingret, F., and Lazdunski, M. (2000) Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett.* 471: 137-140
57. Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and 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
58. Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (2000) TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J.* 19: 2483-2491

59. Schneider, E. R., Anderson, E. O., Gracheva, E. O., and Bagriantsev, S. N. (2014) Temperature sensitivity of two-pore (K2P) potassium channels. *Curr Top Membr.* 74: 113-133
60. Lamas, J. A., Rueda-Ruzafa, L., and Herrera-Perez, S. (2019) Ion Channels and Thermosensitivity: TRP, TREK, or Both? *Int J Mol Sci.* 20: E2371
61. Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., and Lazdunski, M. (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 28: 1308-1318
62. Czirják, G., Petheő, G. L., Spät, A., and Enyedi, P. (2001) Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 281: C700-C708
63. Millar, J. A., Barratt, L., Southan, A. P., Page, K. M., Fyffe, R. E. W., Robertson, B., and Mathie, A. (2000) A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97: 3614-3618
64. Talley, E. M., Lei, Q., Sirois, J. E., and Bayliss, D. A. (2000) TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron.* 25: 399-410
65. Czirják, G., Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., and Enyedi, P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 14: 863-874
66. Chen, X., Talley, E. M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W. E., Dong, B., Viana, F., Garrison, J. C., and Bayliss, D. A. (2006) Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 3422-3427
67. Besana, A., Barbuti, A., Tateyama, M. A., Symes, A. J., Robinson, R. B., and Feinmark, S. J. (2004) Activation of protein kinase C epsilon inhibits the two-pore domain K⁺ channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 279: 33154-33160
68. Barbuti, A., Ishii, S., Shimizu, T., Robinson, R. B., and Feinmark, S. J. (2002) Block of the background K(+) channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic

- effects of platelet-activating factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282: H2024-2030
69. Boyd, D. F., Millar, J. A., Watkins, C. S., and Mathie, A. (2000) The role of Ca²⁺ stores in the muscarinic inhibition of the K⁺ current IK(SO) in neonatal rat cerebellar granule cells. *J Physiol.* 529 Pt 2: 321-331
 70. Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R., and Oliver, D. (2011) Probing the regulation of TASK potassium channels by PI4,5P(2) with switchable phosphoinositide phosphatases. *J Physiol.* 589: 3149-3162
 71. Schiekkel, J., Lindner, M., Hetzel, A., Wemhoner, K., Renigunta, V., Schlichthorl, G., Decher, N., Oliver, D., and Daut, J. (2013) The inhibition of the potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle by endothelin-1 is mediated by phospholipase C. *Cardiovasc Res.* 97: 97-105
 72. Wilke, B. U., Lindner, M., Greifenberg, L., Albus, A., Kronimus, Y., Bunemann, M., Leitner, M. G., and Oliver, D. (2014) Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat Commun.* 5: 5540
 73. Talley, E. M., and Bayliss, D. A. (2002) Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem.* 277: 17733-17742
 74. Kang, D., Han, J., and Kim, D. (2006) Mechanism of inhibition of TREK-2 (K2P10.1) by the Gq-coupled M3 muscarinic receptor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291: C649-656
 75. Murbartian, J., Lei, Q., Sando, J. J., and Bayliss, D. A. (2005) Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J. Biol. Chem.* 280: 30175-30184
 76. Kreneisz, O., Benoit, J. P., Bayliss, D. A., and Mulkey, D. K. (2009) AMP-activated protein kinase inhibits TREK channels. *J. Physiol.* 587: 5819-5830
 77. Lopes, C. M., Rohacs, T., Czirjak, G., Balla, T., Enyedi, P., and Logothetis, D. E. (2005) PIP₂ hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J Physiol.* 564: 117-129
 78. O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N., and Goldstein, S. A. (2002) Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell.* 111: 577-588

79. Rajan, S., Preisig-Muller, R., Wischmeyer, E., Nehring, R., Hanley, P. J., Renigunta, V., Musset, B., Schlichthorl, G., Derst, C., Karschin, A., and Daut, J. (2002) Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol.* 545: 13-26
80. Kilisch, M., Lytovchenko, O., Schwappach, B., Renigunta, V., and Daut, J. (2015) The role of protein-protein interactions in the intracellular traffic of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *Pflugers Arch.* 467: 1105-1120
81. Renigunta, V., Yuan, H., Zuzarte, M., Rinne, S., Koch, A., Wischmeyer, E., Schlichthorl, G., Gao, Y., Karschin, A., Jacob, R., Schwappach, B., Daut, J., and Preisig-Muller, R. (2006) The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic.* 7: 168-181
82. O'Kelly, I., and Goldstein, S. A. (2008) Forward Transport of K2p3.1: mediation by 14-3-3 and COPI, modulation by p11. *Traffic.* 9: 72-78
83. Renigunta, V., Fischer, T., Zuzarte, M., Kling, S., Zou, X., Siebert, K., Limberg, M. M., Rinne, S., Decher, N., Schlichthorl, G., and Daut, J. (2014) Cooperative endocytosis of the endosomal SNARE protein syntaxin-8 and the potassium channel TASK-1. *Mol Biol Cell.* 25: 1877-1891
84. Sandoz, G., Thummler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., and 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
85. Sandoz, G., Tardy, M. P., Thummler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., and 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
86. Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D., and Lesage, F. (2015) The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol.* 593: 2587-2603
87. Franks, N. P., and Honore, E. (2004) The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 601-608

88. Steinberg, E. A., Wafford, K. A., Brickley, S. G., Franks, N. P., and Wisden, W. (2015) The role of K(2)p channels in anaesthesia and sleep. *Pflugers Arch.* 467: 907-916
89. Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thummler, S., Peng, X. D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., Gobbi, G., Vaugeois, J. M., Debonnel, G., and Lazdunski, M. (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci.* 9: 1134-1141
90. Kennard, L. E., Chumbley, J. R., Ranatunga, K. M., Armstrong, S. J., Veale, E. L., and 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
91. Djillani, A., Pietri, M., Mazella, J., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2019) Fighting against depression with TREK-1 blockers: Past and future. A focus on spadin. *Pharmacol Ther.* 194: 185-198
92. Wang, S., Benamer, N., Zanella, S., Kumar, N. N., Shi, Y., Bevenegut, M., Penton, D., Guyenet, P. G., Lesage, F., Gestreau, C., Barhanin, J., and Bayliss, D. A. (2013) TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J. Neurosci.* 33: 16033-16044
93. Bayliss, D. A., Barhanin, J., Gestreau, C., and Guyenet, P. G. (2015) The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. *Pflugers Arch.* 467: 917-929
94. Davies, L. A., Hu, C., Guagliardo, N. A., Sen, N., Chen, X., Talley, E. M., Carey, R. M., Bayliss, D. A., and Barrett, P. Q. (2008) TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 2203-2208
95. Manichaikul, A., Rich, S. S., Allison, M. A., Guagliardo, N. A., Bayliss, D. A., Carey, R. M., and Barrett, P. Q. (2016) KCNK3 Variants Are Associated With Hyperaldosteronism and Hypertension. *Hypertension.* 68: 356-364
96. Ma, L., Roman-Campos, D., Austin, E. D., Eyries, M., Sampson, K. S., Soubrier, F., Germain, M., Tregouet, D. A., Borczuk, A., Rosenzweig, E. B., Girerd, B., Montani, D., Humbert, M., Loyd, J. E., Kass, R. S., and Chung, W. K. (2013) A

- novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 369: 351-361
97. Cunningham, K. P., Holden, R. G., Escribano-Subias, P. M., Cogolludo, A., Veale, E. L., and Mathie, A. (2019) Characterization and regulation of wild-type and mutant TASK-1 two pore domain potassium channels indicated in pulmonary arterial hypertension. *J Physiol.* 597: 1087-1101
 98. Olschewski, A., Li, Y., Tang, B., Hanze, J., Eul, B., Bohle, R. M., Wilhelm, J., Morty, R. E., Brau, M. E., Weir, E. K., Kwapiszewska, G., Klepetko, W., Seeger, W., and Olschewski, H. (2006) Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* 98: 1072-1080
 99. Olschewski, A., Veale, E. L., Nagy, B. M., Nagaraj, C., Kwapiszewska, G., Antigny, F., Lambert, M., Humbert, M., Czirjak, G., Enyedi, P., and Mathie, A. (2017) TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: from cell biology to clinical implications. *Eur Respir J.* 50: 1700754
 100. Murtaza, G., Mermer, P., Goldenberg, A., Pfeil, U., Paddenberg, R., Weissmann, N., Lochnit, G., and Kummer, W. (2017) TASK-1 potassium channel is not critically involved in mediating hypoxic pulmonary vasoconstriction of murine intra-pulmonary arteries. *PLoS One.* 12: e0174071
 101. Kitagawa, M. G., Reynolds, J. O., Wehrens, X. H. T., Bryan, R. M., Jr., and Pandit, L. M. (2017) Hemodynamic and Pathologic Characterization of the TASK-1(-/-) Mouse Does Not Demonstrate Pulmonary Hypertension. *Front Med (Lausanne).* 4: 177
 102. Wiedmann, F., Kiper, A. K., Bedoya, M., Ratte, A., Rinne, S., Kraft, M., Waibel, M., Anad, P., Wenzel, W., Gonzalez, W., Katus, H. A., Decher, N., and Schmidt, C. (2019) Identification of the A293 (AVE1231) Binding Site in the Cardiac Two-Pore-Domain Potassium Channel TASK-1: a Common Low Affinity Antiarrhythmic Drug Binding Site. *Cell Physiol Biochem.* 52: 1223-1235
 103. Schmidt, C., Wiedmann, F., Gaubatz, A. R., Ratte, A., Katus, H. A., and Thomas, D. (2018) New Targets for Old Drugs: Cardiac Glycosides Inhibit Atrial-Specific K2P3.1 (TASK-1) Channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 365: 614-623

104. Schmidt, C., Wiedmann, F., Schweizer, P. A., Katus, H. A., and Thomas, D. (2014) Inhibition of cardiac two-pore-domain K⁺ (K2P) channels--an emerging antiarrhythmic concept. *Eur J Pharmacol.* 738: 250-255
105. Gierten, J., Ficker, E., Bloehs, R., Schweizer, P. A., Zitron, E., Scholz, E., Karle, C., Katus, H. A., and Thomas, D. (2010) The human cardiac K2P3.1 (TASK-1) potassium leak channel is a molecular target for the class III antiarrhythmic drug amiodarone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 381: 261-270
106. Xian Tao, L., Dyachenko, V., Zuzarte, M., Putzke, C., Preisig-Muller, R., Isenberg, G., and Daut, J. (2006) The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovasc Res.* 69: 86-97
107. Mathie, A., and Veale, E. L. (2015) Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflugers Arch.* 467: 931-943
108. Li, X. Y., and Toyoda, H. (2015) Role of leak potassium channels in pain signaling. *Brain Res Bull.* 119: 73-79
109. Tsantoulas, C. (2015) Emerging potassium channel targets for the treatment of pain. *Curr Opin Support Palliat Care.* 9: 147-154
110. Vivier, D., Bennis, K., Lesage, F., and 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
111. Salzer, I., Ray, S., Schicker, K., and Boehm, S. (2019) Nociceptor Signalling through ion Channel Regulation via GPCRs. *Int J Mol Sci.* 20: E2488
112. Busserolles, J., Tsantoulas, C., Eschalier, A., and Lopez Garcia, J. A. (2016) Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. *Pain.* 157 Suppl 1: S7-14
113. Djillani, A., Mazella, J., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2019) Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front Pharmacol.* 10: 379
114. Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lonnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggstrom, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P. V., Linnarsson, S., and Ernfors, P. (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci.* 18: 145-153

115. LaPaglia, D. M., Sapio, M. R., Burbelo, P. D., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Raithel, S. J., Ramsden, C. E., Iadarola, M. J., and Mannes, A. J. (2018) RNA-Seq investigations of human post-mortem trigeminal ganglia. *Cephalalgia*. 38: 912-932
116. Kang, D., and 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-C146
117. Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L., and Lawson, S. N. (2012) Leak K⁽⁺⁾ channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Mol. Cell Neurosci*. 49: 375-386
118. Acosta, C., Djouhri, L., Watkins, R., Berry, C., Bromage, K., and Lawson, S. N. (2014) TREK2 expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous pain. *J. Neurosci*. 34: 1494-1509
119. Dadi, P. K., Vierra, N. C., Days, E., Dickerson, M. T., Vinson, P. N., Weaver, C. D., and Jacobson, D. A. (2017) Selective Small Molecule Activators of TREK-2 Channels Stimulate Dorsal Root Ganglion c-Fiber Nociceptor Two-Pore-Domain Potassium Channel Currents and Limit Calcium Influx. *ACS Chem Neurosci*. 8: 558-568
120. Viatchenko-Karpinski, V., Ling, J., and Gu, J. G. (2018) Characterization of temperature-sensitive leak K⁽⁺⁾ currents and expression of TRAAK, TREK-1, and TREK2 channels in dorsal root ganglion neurons of rats. *Mol Brain*. 11: 40
121. Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2003) A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem*. 278: 27406-27412
122. Czirják, G., Tóth, Z. E., and 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
123. Rahm, A. K., Wiedmann, F., Gierten, J., Schmidt, C., Schweizer, P. A., Becker, R., Katus, H. A., and Thomas, D. (2013) Functional characterization of zebrafish

- K2P18.1 (TRESK) two-pore-domain K⁺ channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 387: 291-300
124. Kang, D., Mariash, E., and Kim, D. (2004) Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* 279: 28063-28070
 125. Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., Wischmeyer, E., and 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
 126. Lafreniere, R. G., Cader, M. Z., Poulin, J. F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafreniere, F., McLaughlan, S., Dube, M. P., Marcinkiewicz, M. M., Ramagopalan, S., Ansorge, O., Brais, B., Sequeiros, J., Pereira-Monteiro, J. M., Griffiths, L. R., Tucker, S.J., Ebers, G., and Rouleau, G. A. (2010) A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat. Med.* 16: 1157-1160
 127. Cadaveira-Mosquera, A., Perez, M., Reboreda, A., Rivas-Ramirez, P., Fernandez-Fernandez, D., and Lamas, J. A. (2012) Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system. *J. Mol. Neurosci.* 48: 86-96
 128. Grabauskas, G., Wu, X., Zhou, S., Li, J., Gao, J., and Owyang, C. (2019) High-fat diet-induced vagal afferent dysfunction via upregulation of 2-pore domain potassium TRESK channel. *JCI Insight.* 4
 129. Hughes, S., Foster, R. G., Peirson, S. N., and Hankins, M. W. (2017) Expression and localisation of two-pore domain (K2P) background leak potassium ion channels in the mouse retina. *Sci Rep.* 7: 46085
 130. Flegel, C., Schobel, N., Altmuller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., and Gisselmann, G. (2015) RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. *PLoS One.* 10: e0128951
 131. Manteniotis, S., Lehmann, R., Flegel, C., Vogel, F., Hofreuter, A., Schreiner, B. S., Altmuller, J., Becker, C., Schobel, N., Hatt, H., and Gisselmann, G. (2013) Comprehensive RNA-Seq expression analysis of sensory ganglia with a focus on ion channels and GPCRs in Trigeminal ganglia. *PLoS One.* 8: e79523

132. Kollert, S., Dombert, B., Doring, F., and Wischmeyer, E. (2015) Activation of TRESK channels by the inflammatory mediator lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling. *Sci Rep.* 5: 12548
133. Du, X., Hao, H., Gigout, S., Huang, D., Yang, Y., Li, L., Wang, C., Sundt, D., Jaffe, D. B., Zhang, H., and Gamper, N. (2014) Control of somatic membrane potential in nociceptive neurons and its implications for peripheral nociceptive transmission. *Pain.* 155: 2306-2322
134. Keshavaprasad, B., Liu, C., Au, J. D., Kindler, C. H., Cotten, J. F., and Yost, C. S. (2005) Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. *Anesth. Analg.* 101: 1042-1049
135. Czirják, G., and Enyedi, P. (2006) Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol. Pharmacol.* 69: 1024-1032
136. Rahm, A. K., Gierten, J., Kisselbach, J., Staudacher, I., Staudacher, K., Schweizer, P. A., Becker, R., Katus, H. A., and Thomas, D. (2012) PKC-dependent activation of human K2P18.1 K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 166: 764-773
137. Callejo, G., Giblin, J. P., and Gasull, X. (2013) Modulation of TRESK background K⁺ channel by membrane stretch. *PLoS. One.* 8: e64471
138. Kang, D., Kim, G. T., Kim, E. J., La, J. H., Lee, J. S., Lee, E. S., Park, J. Y., Hong, S. G., and Han, J. (2008) Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 609-615
139. Andres-Enguix, I., Shang, L., Stansfeld, P. J., Morahan, J. M., Sansom, M. S., Lafreniere, R. G., Roy, B., Griffiths, L. R., Rouleau, G. A., Ebers, G. C., Cader, Z. M., and Tucker, S. J. (2012) Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K⁺ channel. *Sci. Rep.* 2: 237
140. Braun, G., Nemcsics, B., Enyedi, P., and Czirják, G. (2011) TRESK background K⁺ channel is inhibited by PAR-1/MARK microtubule affinity-regulating kinases in *Xenopus* oocytes. *PLoS. One.* 6: e28119
141. Berkefeld, H., Fakler, B., and Schulte, U. (2010) Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev.* 90: 1437-1459
142. Czirják, G., and Enyedi, P. (2010) TRESK background K⁺ channel is inhibited by phosphorylation via two distinct pathways. *J. Biol. Chem.* 285: 14549-14557

143. Li, H., Rao, A., and Hogan, P. G. (2011) Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol.* 21: 91-103
144. Czirják, G., and 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
145. Czirják, G., and Enyedi, P. (2014) The LQLP calcineurin docking site is a major determinant of the calcium-dependent activation of human TRESK background K⁺ channel. *J Biol Chem.* 289: 29506-29518
146. Matenia, D., and Mandelkow, E. M. (2009) The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 34: 332-342
147. Czirják, G., Vuity, D., and Enyedi, P. (2008) Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J. Biol. Chem.* 283: 15672-15680
148. Enyedi, P., Braun, G., and Czirják, G. (2012) TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol. Cell Endocrinol.* 353: 75-81
149. Chae, Y. J., Zhang, J., Au, P., Sabbadini, M., Xie, G. X., and Yost, C. S. (2010) Discrete change in volatile anesthetic sensitivity in mice with inactivated tandem pore potassium ion channel TRESK. *Anesthesiology.* 113: 1326-1337
150. Guo, Z., Liu, P., Ren, F., and Cao, Y. Q. (2014) Nonmigraine-associated TRESK K⁺ channel variant C110R does not increase the excitability of trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 112: 568-579
151. Guo, Z., and Cao, Y. Q. (2014) Over-Expression of TRESK K⁺ Channels Reduces the Excitability of Trigeminal Ganglion Nociceptors. *PLoS. One.* 9: e87029
152. Zhou, J., Yang, C. X., Zhong, J. Y., and Wang, H. B. (2013) Intrathecal TRESK gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Neuroreport.* 24: 131-136
153. Liu, P., Xiao, Z., Ren, F., Guo, Z., Chen, Z., Zhao, H., and Cao, Y. Q. (2013) Functional analysis of a migraine-associated TRESK K⁺ channel mutation. *J. Neurosci.* 33: 12810-12824
154. Guo, Z., Qiu, C. S., Jiang, X., Zhang, J., Li, F., Liu, Q., Dhaka, A., and Cao, Y. Q. (2019) TRESK K(+) Channel Activity Regulates Trigeminal Nociception and Headache. *eNeuro.* 6

155. Weir, G. A., Pettingill, P., Wu, Y., Duggal, G., Ilie, A. S., Akerman, C. J., and Cader, M. Z. (2019) The Role of TRESK in Discrete Sensory Neuron Populations and Somatosensory Processing. *Front Mol Neurosci.* 12: 170
156. Mazella, J., Petrault, O., Lucas, G., Deval, E., Beraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., Taouji, S., Conductier, G., Corinus, A., Coppola, T., Gobbi, G., Nahon, J. L., Heurteaux, C., and 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
157. Borsotto, M., Veyssiere, J., Moha Ou Maati, H., Devader, C., Mazella, J., and Heurteaux, C. (2015) Targeting two-pore domain K(+) channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *Br J Pharmacol.* 172: 771-784
158. Braun, G., Lengyel, M., Enyedi, P., and Czirják, G. (2015) Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *Br J Pharmacol.* 172: 1728-1738
159. Czirják, G., and Enyedi, P. (2003) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* 63: 646-652
160. Bautista, D. M., Sigal, Y. M., Milstein, A. D., Garrison, J. L., Zorn, J. A., Tsuruda, P. R., Nicoll, R. A., and Julius, D. (2008) Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci.* 11: 772-779
161. Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., and Gasull, X. (2011) TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol. Pain.* 7: 30
162. Castellanos, A., Andres, A., Bernal, L., Callejo, G., Comes, N., Gual, A., Giblin, J. P., Roza, C., and Gasull, X. (2018) Pyrethroids inhibit K2P channels and activate sensory neurons: basis of insecticide-induced paraesthesias. *Pain.* 159: 92-105
163. Veale, E. L., and 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.* 173: 1639-1652

164. Wright, P. D., Weir, G., Cartland, J., Tickle, D., Kettleborough, C., Cader, M. Z., and Jerman, J. (2013) Cloxyquin (5-chloroquinolin-8-ol) is an activator of the two-pore domain potassium channel TRESK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441: 463-468
165. Lengyel, M., Dobolyi, A., Czirják, G., and Enyedi, P. (2017) Selective and state-dependent activation of TRESK (K2P 18.1) background potassium channel by cloxyquin. *Br J Pharmacol.* 174: 2102-2113
166. Steinberg, S. F. (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 88: 1341-1378
167. Egenberger, B., Polleichtner, G., Wischmeyer, E., and Doring, F. (2010) N-linked glycosylation determines cell surface expression of two-pore-domain K⁺ channel TRESK. *Biochem Biophys Res Commun.* 391: 1262-1267
168. Bagowski, C. P., Myers, J. W., and Ferrell, J.E., Jr. (2001) The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 276: 37708-37714
169. Boehmer, C., Palmada, M., Klaus, F., Jeyaraj, S., Lindner, R., Laufer, J., Daniel, H., and Lang, F. (2008) The peptide transporter PEPT2 is targeted by the protein kinase SGK1 and the scaffold protein NHERF2. *Cell Physiol Biochem.* 22: 705-714
170. Watkins, J. L., Lewandowski, K. T., Meek, S. E., Storz, P., Toker, A., and Piwnicka-Worms, H. (2008) Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 18378-18383
171. Uberall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H. H., and Baier, G. (1997) Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 272: 4072-4078
172. Baier-Bitterlich, G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A., and Baier, G. (1996) Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 16: 1842-1850

173. Khasar, S. G., Lin, Y. H., Martin, A., Dadgar, J., McMahon, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K. O., Isenberg, W., McCarter, G., Green, P. G., Hodge, C. W., Levine, J. D., and Messing, R. O. (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron*. 24: 253-260
174. Aley, K. O., Messing, R. O., Mochly-Rosen, D., and Levine, J. D. (2000) Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci*. 20: 4680-4685
175. Dina, O. A., Chen, X., Reichling, D., and Levine, J. D. (2001) Role of protein kinase C epsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*. 108: 507-515
176. Pan, H. L., Zhang, Y. Q., and Zhao, Z. Q. (2010) Involvement of lysophosphatidic acid in bone cancer pain by potentiation of TRPV1 via PKC epsilon pathway in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain*. 6: 85
177. Honda, K., Shinoda, M., Kondo, M., Shimizu, K., Yonemoto, H., Otsuki, K., Akasaka, R., Furukawa, A., and Iwata, K. (2017) Sensitization of TRPV1 and TRPA1 via peripheral mGluR5 signaling contributes to thermal and mechanical hypersensitivity. *Pain*. 158: 1754-1764
178. Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., and Tominaga, M. (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C epsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*. 277: 13375-13378
179. Kandasamy, R., and Price, T. J. (2015) The pharmacology of nociceptor priming. *Handb Exp Pharmacol*. 227: 15-37
180. Parada, C. A., Yeh, J. J., Reichling, D. B., and Levine, J. D. (2003) Transient attenuation of protein kinase C epsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*. 120: 219-226
181. Reichling, D. B., and Levine, J. D. (2009) Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci*. 32: 611-618
182. Zhou, Y., Li, G. D., and Zhao, Z. Q. (2003) State-dependent phosphorylation of epsilon-isozyme of protein kinase C in adult rat dorsal root ganglia after inflammation and nerve injury. *J Neurochem*. 85: 571-580
183. Maher, B. H., Taylor, M., Stuart, S., Okolicsanyi, R. K., Roy, B., Sutherland, H. G., Haupt, L. M., and Griffiths, L. R. (2013) Analysis of 3 common

- polymorphisms in the KCNK18 gene in an Australian Migraine case-control cohort. *Gene*. 528: 343-346
184. Domitrz, I., Kosiorek, M., Zekanowski, C., and Kaminska, A. (2016) Genetic studies of Polish migraine patients: screening for causative mutations in four migraine-associated genes. *Hum Genomics*. 10: 3
 185. Rainero, I., Rubino, E., Gallone, S., Zavarise, P., Carli, D., Boschi, S., Fenoglio, P., Savi, L., Gentile, S., Benna, P., Pinessi, L., and Dalla Volta, G. (2014) KCNK18 (TRESK) genetic variants in Italian patients with migraine. *Headache*. 54: 1515-1522
 186. Han, J. Y., Jang, J. H., Park, J., and Lee, I. G. (2018) Targeted Next-Generation Sequencing of Korean Patients With Developmental Delay and/or Intellectual Disability. *Front Pediatr*. 6: 391
 187. Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Gonzalez, W., and Sepulveda, F. V. (2016) Gating, Regulation, and Structure in K2P K⁺ Channels: In Varietate Concordia? *Mol Pharmacol*. 90: 309-317

12. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Pergel E.**, Lengyel M., Enyedi P., Czirják G. (2019) TRESK (K2P18.1) Background Potassium Channel Is Activated by Novel-Type Protein Kinase C via Dephosphorylation. *Mol Pharmacol.* 95:661-672.
IF: 3.853
2. 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. (2019) Chemically Modified Derivatives of the Activator Compound Cloxyquin Exert Inhibitory Effect on TRESK (K2P18.1) Background Potassium Channel. *Mol Pharmacol.* 95:652-660.
IF: 3.853

Egyéb közlemények:

3. Kubinyi E., Bence M., Koller D., Wan M., **Pergel E.**, Rónai Z., Sasvári-Székely M., Miklósi Á. (2017) Oxytocin and Opioid Receptor Gene Polymorphisms Associated with Greeting Behavior in Dogs. *Front Psychol.* 8:1520.
IF: 2.089
4. Kolacsek O., **Pergel E.**, Varga N., Apáti Á., Orbán T.I. (2017) Ct shift: A novel and accurate real-time PCR quantification model for direct comparison of different nucleic acid sequences and its application for transposon quantifications. *Gene.* 598:43-49.
IF: 2.498
5. Szebényi K., Füredi A., Kolacsek O., **Pergel E.**, Bösze Z., Bender B., Vajdovich P., Tóvári J., Homolya L., Szakács G., Héja L., Enyedi Á., Sarkadi B., Apáti Á., Orbán T.I. (2015) Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep.* 5:12645.
IF: 5.228
6. Kis A., Bence M., Lakatos G., **Pergel E.**, Turcsán B., Pluijmakers J., Vas J., Elek Z., Brúder I., Földi L., Sasvári-Székely M., Miklósi A., Rónai Z., Kubinyi E. (2014) Oxytocin receptor gene polymorphisms are associated with human directed social behavior in dogs (*Canis familiaris*). *PLoS One.* 9:e83993.
IF: 3.234

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni elsősorban témavezetőmnek, dr. Czirják Gábornak, aki folyamatos szakmai útmutatást és segítséget nyújtott, illetve köszönet illeti türelméért, támogatásáért is. Köszönettel tartozom dr. Enyedi Péter professzor úrnak a munkámhoz elengedhetetlenül szükséges feltételek biztosításáért, szakmai iránymutatásáért, valamint hogy laboratóriumában dolgozhattam.

Köszönöm dr. Hunyady László professzor úrnak, aki intézetvezetőként, és dr. Ligeti Erzsébet professzor asszonynak, aki doktori programvezetőként lehetővé tette és mindvégig segítette munkámat. Köszönettel és hálával tartozom még az Ioncsatorna és Molekuláris Biológiai Laboratórium minden munkatársának, így különös köszönet illeti Veres Irén és Dobolyi G. Alice asszisztensnőket rengeteg segítségükért és hasznos tanácsaikért, továbbá dr. Lengyel Miklós PhD hallgatót, aki értékes javaslataival és nem egyszer munkájával is hozzájárult a disszertációban tárgyalt eredmények megszületéséhez. Köszönettel tartozom Prof. Mátyus Péternek és Dr. Bálint-Polonkai Ágnesnek a cloxyquinszármazékok előállításáért. Külön köszönet illeti dr. Petheő Gábor docens urat, akinek önzetlen segítségére mindig számíthattam, továbbá dr. Kiss Leventét, aki az oktatással kapcsolatban felmerült kérdéseimre adott szívélyes és pótolhatatlan válaszokat. Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Élettani Intézet minden munkatársának a munkához elengedhetetlen jó légkör megteremtésért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak az elmúlt években nyújtott biztatásukat, türelmüket, támogatásukat és szeretetüket.