

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

Doktori tézisek

Pergel Enikő

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Sipeki Szabolcs, 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

BEVEZETÉS

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. Szemben a kiterjedten kifejeződő TREK és TASK csatornákkal, a TRESK igen specifikusan csak néhány szövetben expresszálódik jelentős mértékben. A csatorna legfontosabb előfordulási helyei a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok, amelyekben a primer szenzoros neuronok expresszálják. A trigeminális ganglionban (TRG) a TRESK mRNS kifejeződésének mértéke még a hátsó gyöki ganglionban (DRG) tapasztalható magas szintű expressziót is kb. 3-szorosan meghaladja. 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. Az egyik tanulmányban a humán TRESK-et a primer szenzoros neuronokban RNS szekvenálás módszerrel a legszelektívebben expresszálódó K^+ csatornának találták az összes létező K^+ csatorna típus közül, összehasonlítva az agyi és több perifériás szöveti expressziós szinttel. (Az összes ioncsatorna közül a TRESK a második legszelektívebben expresszálódó ioncsatornának bizonyult mindkét (DRG és TRG) szövetben, a $Na_v1.8$ feszültségfüggő Na^+ csatorna után.)

A TRESK csatorna jellegzetes háttér K^+ áramot eredményez, aminek makroszkópos feszültség-áram összefüggése mérsékelt kifelé egyenirányítást (rektifikációt) mutat. Az áram kevésbé érzékeny az extra- és intracelluláris pH vagy a hőmérséklet változására, nem befolyásolják jelentős mértékben a mechanikai hatások és nem aktiválódik többszörösen telítettlen zsírsavak adásakor, vagyis a TASK és TREK csatornák

aktivitását általában befolyásoló különböző tényezők hatása nem évenyesül a TRESK-re.

A G_q fehérje kapcsolt receptorok ingerlése is eltérően hat a TRESK áramra, mint a korábban vizsgált TREK és TASK családba tartozó csatornák működésére. Míg a többi K_{2P} csatornát a G_q fehérje kapcsolt receptor ingerlés gátolja, vagy nem befolyásolja, addig a TRESK áram többszörösére növekszik. A TRESK áram növekedés létrejön a csatornával koexpresszált M_1 muszkarinos acetilkolin receptor vagy angiotenzin receptor ingerlésének hatására, de emellett akkor is jelentkezik, ha a csatornát kifejező *Xenopus* petesejt endogén lizofoszfátidsav (LPA) receptorait ingereljük. Ezek a szintén G_q kapcsolt receptorok tehát akkor is előidéznek a TRESK áram 5-10-szeres fokozódását, ha nem overexpresszált mennyiségben, hanem saját endogén expressziós szintjüknek megfelelően vannak jelen. A TRESK áramot aktiválja a hátsó gyöki ganglion neuronok endogén lizofoszfátidsav receptorainak ingerlése is, viszont ez az áram növekedés a TRESK génhányos állatból izolált kontroll sejteken nem jön létre.

A TRESK nagyfokú aktivációját a citoplazma kalcium koncentráció növekedése váltja ki a G_q kapcsolt receptor ingerlés során. A kalcium kelátor EGTA mikroinjektálása a csatornát kifejező petesejtbe teljesen kivédi a TRESK receptor-függő aktivációját. A kalcium által előidézett aktiváció a kalcium/kalmodulin-függő protein foszfatáz kalcineurin közvetítésével jön létre. A kalcineurin közvetlenül kapcsolódik a TRESK csatorna PQIIS és LQLP szekvenciájú kötő motívumaihoz és defoszforilálja az intracelluláris hurok régió 262, 264 és 267 pozícióiban található szerin aminosavakat.

TRESK-hiányos (KO) egér modellben nagyfokú és több modalitásra kiterjedő fájdalomérzés fokozódást írtak le a feji területen. Fokozott érzékenység jelentkezett a fájdalmas mechanikai, hő és kémiai ingerekre egyaránt. A KO egérből izolált TRG neuronok ingerlékenysége fokozott volt, összehasonlítva a vad típusú állatból nyert sejtekkel. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal, hogy a TRESK egyik speciális keretelződéses mutációja (F139WfsX24) emberben öröklődő migrénes fejfájással asszociált. Érdekes módon a KO állat testén, a DRG neuronok által ellátott területen a fájdalmas ingerekre adott válasz nem vagy csak minimális mértékben fokozódott. Ennek megfelelően a KO állatból izolált DRG neuronok ingerlékenysége nem tért el jelentősen a vad típustól, habár a TRESK áram egyértelműen hiányzott. Vélhetően a KO állatban, a DRG neuronokban az egyéb K^+ csatornák kompenzatórikus overexpressziója nagyobb mértékű, mint a TRG neuronokban, és ez lehet felelős a különböző testtájakon eltérő mértékben jelentkező fájdalomérzés változásokért.

Ann-Kathrin Rahm és munkatársai leírták, hogy a humán TRESK csatorna áramát a forbol-mirisztol-acetát (PMA, 100 nM) körülbelül 30 perc alatt, jelentős mértékben (kb. 3-szorosra) aktiválja *Xenopus* petesejt heterológ expressziós rendszerben. A hatást a protein kináz C (PKC) gátlószerek mérsékelték, a kalcineurin gátlószerek viszont nem befolyásolták. A TRESK PKC foszforilációs konszenzus szekvenciáinak mutációi szintén nem befolyásolták a PMA által okozott aktivációt. Ezek az adatok arra utaltak, hogy a PKC által létrehozott TRESK aktiváció a csatorna egy új, kalcineurintól független szabályozási mechanizmusán alapul, ezért megkezdjük a TRESK és a PKC interakciójának vizsgálatát farmakológiai és molekuláris biológiai eszközökkel.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A forbol-mirisztin-acetát (PMA) által létrehozott és a calcineurin-függő TRESK aktiváció összefüggésének vizsgálata, mutáns TRESK csatornák felhasználásával, vagy a kétféle ingerlés egymást követő alkalmazásával.
2. Olyan PKC izoenzim azonosítása, amelynek koexpressziója a csatornával a PMA hatását reprodukálja, vagyis TRESK aktivációt eredményez.
3. A PMA és PKC koexpresszió hatásának vizsgálata olyan körülmények között, amikor a TRESK csatornát a megfelelő mikrotubulus-affinitás reguláló kináz (MARK) konstrukcióval foszforiláljuk.
4. Módszer beállítása a TRESK csatorna foszforilációs állapotának biokémiai megítélésére. A calcineurin általi defoszforiláció közvetlen kimutatása, illetve a PMA TRESK foszforilációra kifejtett hatásának tanulmányozása.

MÓDSZEREK

Plazmid konstrukciók és cRNS szintézis

A humán TRESK csatorna cDNS-t tartalmazó *Xenopus* petesejt expressziós plazmid laboratóriumunkban rendelkezésre állt. Az "új típusú" (novel) PKC izoenzimeket (η és ϵ) polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszoroztuk, Pfu polimeráz segítségével, reverz transzkripciót követően. A reakcióhoz a totál RNS-t TRIzol reagenssel tisztítottuk egér agyból. A PKC η cDNS-ét az EcoRI és XhoI restriktív enzimek felhasználásával klónoztuk a pXEN *Xenopus* petesejt expressziós vektorba (GenBank EU267939.1), míg a PKC ϵ -t az Eco81I és XhoI enzimek segítségével. Az egér MARK2 kettős izoformájának klónozását munkacsoportunk korábban közölte, a megfelelő kináz cDNS a pXEN vektorba klónozva munkám kezdetén rendelkezésre állt. A MARK2 Δ konstrukciót ebből alakítottuk ki úgy, hogy a kináz a 361-es aminosavmaradéknál PCR módszer alkalmazásával csonkoltuk.

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. A mutáló primerek a kívánt mutáción kívül csendes (silent) mutációt is tartalmaztak, ami az aminosav szekvenciát nem változtatta meg, de új egyedi restriktív hasítási helyet alakított ki a megváltoztatott DNS-ben.

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-(YPYDVDPDYA)-GG-(YPYDVDPDYA)-GHP szekvenciára módosítottuk, ahol a két glicin aminosavval elválasztott két HA epitópot zárójelek között tüntettük fel. A HA₂-N70Q-hTRESK konstrukcióban a HA epitópokon kívül kialakítottuk az N70Q mutációt is, a csatorna N-glikozilációjának kivédésére.

A cRNS-eket az mMMESSAGE mMACHINE T7 Transcription kittel szintetizáltuk in vitro a gyártó előírásainak megfelelően (Ambion). A cRNS integritást formaldehides denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük etídium-bromid festéssel.

A *Xenopus* petesejtek preparálása és mikroinjektálása

Az afrikai karmosbékákból (*Xenopus laevis*) petesejteket preparáltunk és kollagenázos emésztést követően a folliculáris réteget mechanikai úton finom csipeszekkel távolítottuk el a petesejtek felszínéről. Az expresszálni kívánt cRNS-t a preparálás utáni napon mikroinjektáltuk. A méréseket és biokémiai vizsgálatokat három nappal az injektálás után végeztük.

Két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) mérés

A *Xenopus* petesejtekben a TRESK áramot két-elektrodos feszültségzár (voltage clamp) módszerrel mértük OC-725C erősítő alkalmazásával (Warner Instrument Corp.). Az elektrofiziológiai méréseinkből származó adatokat Digidata Interface (Axon Instruments, Foster City, CA) segítségével digitalizáltuk és a pClamp szoftvercsomag (Molecular Devices) komponenseivel regisztráltuk. Az alacsony K⁺ koncentrációjú extracelluláris oldat mM-ban kifejezve a következőket tartalmazta: NaCl 95.4, KCl 2, CaCl₂ 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 gravitációs módon működő perfúziós rendszerrel.

A boroszilikát üveg 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 feszültség-lépés végén, szobahőmérsékleten (21 °C). Az így kapott áramból levontuk az alacsony $[K^+]$ -jú oldatban mért áram nagyságát. A desztillált vízzel injektált *Xenopus* petesejtek endogén K^+ árama jellemzően legalább egy nagyságrenddel kisebb volt, mint a TRESK konstrukciókkal kifejezett áram amplitúdók.

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

A HA₂-N70Q-hTRESK konstrukciót kifejező *Xenopus* petesejtek egyenlő számú csoportjaiból plazmamembrán preparátumot készítettünk, üveg Potter homogenizálást követő megfelelő centrifugálási lépésekkel. A plazmamembrán preparátumot feloldottuk SDS-mintapufferben, majd ezt használtuk a további kísérletekben.

A petesejteket 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 μ M) és FK506 (tacrolimus, 1 μ M) kalcineurin gátlószerek jelenlétében. A negatív kontroll sejteket, amelyekben a

TRESK csatorna foszforilációja fenntartott, ugyanígy kezeltük kalcineurin gátlószerekkel, de PMA hozzáadása nélkül. Emellett kétféle pozitív kontrollt alkalmaztunk. Az egyik esetben a plazmamembrán preparátumot *in vitro* defoszforiláltuk λ foszfatázzal. A másik pozitív kontroll csoportban 3 percig ionomycinnel (1 μM) kezeltük a petesejteket a homogenizálás előtt, kalcineurin gátlószerek nélkül.

A különböző előkezeléseken átment petesejt csoportokból származó TRESK fehérjéket a Phos-tag™ SDS-PAGE módszerrel választottuk szét (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). A Zn^{2+} -Phos-tag módszert használtuk 8%-os poliakrilamid gélekkel és a neutrális (Tris-MOPS) pufferrendszert. A Phos-tag koncentráció 15 μM volt a kísérletekben. A mintákhoz a felvitel előtt ZnCl_2 -ot és NaOH-ot adtunk az EDTA telítésére és az alkalikus pH helyreállítására. A Phos-tag SDS-PAGE gélen az elektroforézist 50 V-on végeztük.

A Phos-tag gélen szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk, 20 % metanolt és 0.05 % SDS-t tartalmazó Towbin transzfer pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, pH 8.6 ± 0.2), nedves/tartály módszerrel (wet/tank blotting). 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 (foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldatban, PBS-ben). 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). 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 TRESK fehérjét fokozott kemilumineszcencia módszerrel detektáltuk a gyártó leírásának megfelelően (WesternBright ECL HRP, Advansta).

Adatok kiértékelése és statisztikai analízis

Az adatok átlag \pm az átlag hibája (standard error of the mean, S.E.M.) formában kerültek megadásra. A különbség(ek)et $p < 0.05$ esetén tekintettük a szignifikánsnak. 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. Az adatokat az egyes kísérletekben leggyakrabban homo- vagy heteroszkedasztikus Student t-teszttel, egyutas (Fisher) ANOVA-val és ezt követően Tukey HSD post hoc teszttel, vagy Welch variancia analízissel és Games-Howell post hoc teszttel értékeltük. A nem paraméteres tesztek közül a Mann-Whitney U tesztet használtuk. 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) ImageJ 1.47v szoftverével analizáltuk.

EREDMÉNYEK

A PMA minden vizsgált *Xenopus* petesejt preparátumban jelentős mértékben növelte a humán TRESK K^+ áramot, az áram növekedése, átlagát tekintve jellemzően kétszeres és több mint hatszoros között változott. Első vizsgálatsorozatunkban arra voltunk kíváncsiak, 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.

A TRESK-PQAAAS-AQAP konstrukción teszteltük a PMA hatását, amiben a PQIIS és LQLP kalcineurin-kötő szekvenciákat alanin cserékkel funkcióképtelenné tettük. A PMA adása után a TRESK-PQAAAS-AQAP csatornát kifejező petesejtekben hasonló áram növekedést kaptunk, mint a vad típusú csatornát expresszáló sejtekben. Ez arra utalt, hogy a kalcineurin-függő aktivációs mechanizmus kiiktatása nem védi ki a PMA hatását, tehát a protein kináz C nem a kalcineurin közreműködésével aktiválja a TRESK csatornát.

Ugyanezt a kísérletet elvégeztük olyan mutáns TRESK csatornával is, amiben a 264-es szerin aminosavat alaninra cseréltük. Ez a csatorna konstitutív aktivitást mutat, mivel a defoszforilált állapotot utánozza az egyik legfontosabb kalcineurin-függő szabályozási ponton. A TRESK S264A mutáns árama PMA hatására egyáltalán nem növekedett. Ha a S264 aminosav foszforilált állapotát próbáltuk utánozni glutamát szubsztitúcióval, akkor a S264E mutáns TRESK csatornát sem aktiválta a PMA egyáltalán. Ez megerősítette a S264A mutánssal kapott eredményt; ha a csatorna foszforiláció-függő szabályozását a S264-es pozícióban

lehetetlenné tesszük, akkor az kivédi a protein kináz C által okozott TRESK áram aktivációt.

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. Az ionomycin PMA után nem eredményezett nagyobb végső TRESK aktivitási szintet, mint az ionofór alkalmazása önmagában. Ez kompatibilis azzal a hipotézissel, hogy a kalcineurin-függő és PMA által kiváltott aktivációs mechanizmusok közös ponton konvergálnak, a S264 aminosav defoszforilálásán. Felvetődött tehát a kérdés, hogy a PMA kezelés hogyan vezethet a S264 defoszforilációjához.

A TRESK áram visszatérése a nyugalmi (gátolt) állapotba a kalcineurin-függő aktivációt követően a S264-et 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 μ M), vagy ionomycin és PMA (100 nM) kombinációjával ingereltük, és a két csoportban összehasonlítottuk a K^+ áram visszatérését a nyugalmi állapotba. Ha az ionomycin mellett PMA-t is adtunk, akkor az inger elvonását követően a K^+ áram sokkal lassabban tért vissza a nyugalmi állapotba, mint PMA nélkül. Ez arra utalt, hogy a PMA hatására gátlódik az a kináz, ami a

TRESK csatornában a szabályozó jelentőséggel bíró S264 aminosavat foszforilálja.

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 S264 területét a TRESK csatornában foszforilálja a mikrotubulus-affinitás-reguláló kináz család három tagja (MARK1-3). Ezért megkíséreltük a MARK2 kináz koexpressziójával kivédeni a PMA hatását. Egy olyan MARK2 Δ konstrukciót alkalmaztunk, aminek aktivitása nem függött a PMA kezeléstől, mert a kináz szabályozó régióját csonkoltuk. Amikor a MARK2 Δ konstrukciót koexpresszáltuk a TRESK csatornával, akkor a PMA hatására többé nem jött létre csatorna aktiváció. 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 jelenlétében, mint a csak csatornát expresszáló kontroll csoportban. A MARK2 Δ koexpressziója a TRESK csatornával fenntartotta a S264 foszforilációját a PMA által okozott lassú defoszforiláló hatással szemben, azonban nem tudta ellensúlyozni a calcineurin túlárado foszfatáz aktivitását, amikor az a csatornához közvetlenül kötődve defoszforilált.

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

továbbiakban nem foglalkoztunk. A PKC η és PKC ϵ viszont egyértelműen hatott a TRESK áramra.

A PKC η koexpresszió a TRESK bazális áramot átlagát tekintve mintegy kétszeresére növelte, azonban a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns a csoportokon belüli csatorna expresszió nagyfokú szórása miatt. 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 egybehangzóak azzal, hogy a TRESK árama PKC η jelenlétében már részlegesen aktivált volt bazális körülmények között is, az ionomycin adása előtt.

A TRESK áram visszatérését a nyugalmi állapotba a kalcineurin-függő aktivációból szintén jelentősen megváltoztatta a PKC η koexpresszió. A kontroll, csak TRESK-et expresszáló csoportban az aktiváció a maximális érték 30 ± 5 %-ára tért vissza a mérés végén. Ezzel szemben a TRESK-et PKC η -val koexpresszáló csoportban a mérés végén az áram még 73 ± 8 %-ban aktivált maradt ($p<0.001$, 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 visszaállítás 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 csatorna szabályozásában.

A fenti megfigyeléseket független kísérletben reprodukáltuk a humán TRESK-S252A mutáns és a vad típusú PKC ϵ izoforma koexpressziójával. Ugyanebben a kísérletben a K437R kináz-inaktív PKC ϵ mutáns koexpressziója nem befolyásolta a TRESK áram tulajdonságait. A S252 szabályozási pont működése és a 14-3-3 adapter fehérje kihorgonyozódása a csatornához tehát nem nélkülözhetetlen a PKC által kiváltott TRESK aktivációhoz, viszont a PKC ϵ kináz enzimaktivitása elengedhetetlen a hatás kialakulásához.

Megvizsgáltuk, hogy a PKC koexpresszió TRESK csatornára kifejtett hatását is kivédi-e a MARK2 Δ , úgy ahogy a PMA általi TRESK aktivációt megakadályozta a fentebb leírtaknak megfelelően. Ebben a kísérletben a PKC ϵ konstitutívan aktív A159E mutáns (PKC ϵ -CA) változatát használtuk, ami nagyobb kináz aktivitású, mint a vad típusú enzim nyugalmi állapotban. Ha ezt a felerősített aktivitású PKC ϵ -CA konstrukciót koexpresszáltuk a TRESK csatornával, akkor nagy bazális áramot kaptunk ($6.5 \pm 1.2 \mu\text{A}$, $n=10$). Olyan mértékben aktiválódott a csatorna, hogy az ionomycin az áramot már csak 1.5 ± 0.1 -szeresére tudta tovább növelni. Emellett, az ionomycin elvonását követően a mérés végéig a K $^+$ áram egyáltalán nem tért vissza a kiindulási érték felé; az aktivitás 154 ± 25 %-os szintet ért el a mérés végén.

Ha viszont a TRESK és PKC ϵ -CA mellett a MARK2 Δ kinázt is koexpresszáltuk (háromszoros koexpresszió), akkor az alapáram $2.6 \pm 0.6 \mu\text{A}$ nagyságúra csökkent ($n=9$, $p<0.01$, t-teszt). Ezt a kisebb áramot az ionomycin erőteljesebben fokozta (3.2 ± 0.3 -szorosára, $p<0.002$, t-teszt). Emellett, az ionomycin elvonását követően a K $^+$ áram 5 percen belül teljesen visszatért az ingerlés előtti gátolt állapotba (az aktiváció 9 ± 5 %-

a maradt fenn, $p < 0.0005$, Mann-Whitney U teszt). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a konstitutívan aktív PKC ϵ rendkívül erőteljesen fokozta a TRESK bazális aktivitást. A csatornák többsége már eleve is defoszforilált állapotban volt, mivel a konstitutívan aktív PKC ϵ gátolta a S264-et foszforiláló endogén kinázt. A PKC ϵ hatása iránt érzéketlenné tett MARK2 Δ viszont helyreállította a S264 bazális foszforilációját és a TRESK nyugalmi gátolt állapotát, illetve felgyorsította a csatorna visszafoszforilálódását az ionomycin hatására létrejövő defoszforilációt követően.

Phos-tagTM SDS-PAGE módszerrel megvizsgáltuk a HA₂-N70Q-hTRESK 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 foszoproteinek foszfát csoportját, és csökkenti azok mobilitását az elektroforézis folyamán. A módszer – számos előre nem várt hátrányának részleges kompenzációját követően – alkalmassá vált a TRESK foszforiláció vizsgálatára. Elsőként mutattuk ki közvetlenül, hogy a sejt plazmamembránjában elhelyezkedő TRESK fehérje tényleg defoszforilálódik a kalcineurin aktiváció hatására. Emellett minden kétséget kizáróan igazoltuk, hogy a PMA kezelés szintén a csatornafehérje defoszforilációját eredményezi.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A PMA által TRESK csatornára kifejttet 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 változatának koexpressziója kivédi az "új-típusú" PKC hatását.

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.**, Bősze 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 Á., 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)

