

A primer érzőneuronok nyugalmi membránpotenciálját meghatározó TRESK háttér K^+ csatorna molekuláris szabályozási mechanizmusainak vizsgálata

A kutatás eredményeinek bemutatása a nyilvánosság számára

A TRESK háttér kálium csatorna jelentős mennyiségben kifejeződik az elsődleges érző idegsejtekben. Ezek a sejtek felelősek pl. a tapintási, hő- és az orvosi szempontból kiemelten jelentős fájdalomérzetet okozó ingerek érzékeléséért. A TRESK csatorna megnyílása kálium ionok kiáramlását eredményezi a sejtet határoló membránon keresztül és a pozitív töltésű ionok távozása a sejt belső terét negatívabbá teszi. Ez a feszültségváltozás csökkenti az idegsejt ingerlékenységét, vagyis a környezetből érkező ingerek hatása kevésbé érvényesül. Több állatkísérletes modellben is kimutatták, hogy a TRESK csatorna aktiválása csökkenti a fájdalmat. Mivel több fájdalom típus orvosi kezelése mindeztidáig nem megnyugtató módon megoldott, ezért a TRESK vizsgálata ebből a gyakorlati szempontból érdeklődésre tart számot. Emellett a TRESK csatorna egyik különleges és ritka mutációjáról leírták, hogy az érintett család tagjaiban súlyos fejfájás, migrén alakult ki. Ez alapján felvetődött a lehetőség, hogy a TRESK aktivációjával talán lehetséges e néptömegeket érintő makacs fejfájás enyhítése.

Munkacsoportunk több mint 20 évvel ezelőtt az elsők között írta le a TRESK felfedezését, és már ebben a kezdeti időszakban felfigyeltünk a csatorna sajátos szabályozási mechanizmusaira. A következő két évtizedben ezeket a szabályozási mechanizmusokat tanulmányoztuk és jelentős előrelépést értünk el ezek megértésében. Munkánk elsődleges célja, hogy minél pontosabban felderítsük azokat a tényezőket és mechanizmusokat, amelyek megváltoztatják a TRESK csatorna aktivitását. Ez a munka alap kutatásnak számít, korábban ismeretlen folyamatok felismerése és a hozzájuk tartozó alapfogalmak kialakítása a fő cél, nem egy gyakorlati probléma közvetlen megoldása. Amikor valaki ma azt kérdezi, hogy a TRESK csatorna hogyan járul hozzá az érző működéshez, vagy azt, hogy a milyen szerepet játszik a csatorna kalcium-függő szabályozása a fájdalomérzésben, akkor olyan fogalmakat használ, amelyek egyszerűen nem léteztek a munkánkat megelőzően. Az alapfogalmak használata egy idő után teljesen természetessé válik, és néhány évtized távlatából az alap kutatás ezek kialakítására tett erőfeszítései a homályba vesznek. Pedig valójában az alap kutatás alakítja ki a fogalmi keretet, amelyen belül a gyakorlati problémákat közvetlenül célzó alkalmazott kutatás és ipari fejlesztés is mozoghat.

Az NKFIH OTKA K127988 kutatási támogatás segítségével hat év alatt elvégzett kutatásaink a TRESK csatorna szabályozás megismerésének következő lépcsőfokát jelentették. Legfontosabb eredményeink az alábbi gondolatkörök köré csoportosíthatók.

1. Az új típusú *protein kináz C (PKC)* közvetve, *defoszforiláción keresztül aktiválja a TRESK csatornát.* Dierk Thomas heidelbergi kutatócsoportja 2012-ben számolt be arról, hogy a *protein kináz C (PKC)* aktiválja a béka petesejtekben kifejezett humán TRESK csatornát. Ez a közlemény felkeltette az érdeklődésünket, mert nehezen volt összeegyeztethető a korábbi eredményeinkkel. Korábban leírtuk ugyanis, hogy a TRESK csatorna defoszforilációja, vagyis a csatornafehérjéhez kapcsolódó foszfátcsoportok eltávolítása, aktiváló hatású. Hogyan lehetséges akkor, hogy a PKC enzim, amely foszfátcsoportokat köt a fehérjékhez, szintén aktiválja a TRESK csatornát és nem gátolja azt, ahogy elsőre várnánk? Kutatásunk eredményeként tisztáztuk ezt a látszólagos ellentmondást és megértettük, hogy mi áll a jelenség hátterében. Legvalószínűbb magyarázatként azt találtuk, hogy a PKC hatása közvetett. A PKC nem foszforilálja közvetlenül a TRESK csatorna szabályozásban fontos részét, vagyis nem köt oda

foszfátcsoportokat. Ehelyett arra a kináz enzimre hat, amely a TRESK csatornát foszforilálja. Amikor a PKC gátolja a TRESK-et foszforiláló kinázt, akkor az nem köt foszfátcsoportokat a csatornára és azok hiányában a TRESK aktivációja jön létre. Vagyis, paradox módon, a PKC aktiválódása a csatorna defoszforilációját eredményezi, amelyről korábban már megmutattuk, hogy az aktiváló hatású. Ez a következtetés egyáltalán nem kézenfekvő és alapvetően befolyásolhatja azoknak a gondolkodását, akik a PKC és a TRESK kapcsolatát vizsgálják a jövőben. A PKC új típusú izoformái kifejeződnek az elsődleges érző neuronokban és fontos szerepet játszanak a krónikus, hosszan tartó fájdalom erősségének beállításában. Izgalmas nyitott kérdés marad, hogy a PKC és TRESK hasonló kölcsönhatást mutat-e az érzőneuronokban, mint azt a békapeteséjt modellben találtuk, a heidelbergi munkacsoport kiváló kezdeti eredményeit kiegészítve és értelmezve.

2. A TRESK intracelluláris C-terminális régiója (iCtr) alapvetően hozzájárul a magas csatornaaktivitás kialakításához. Az epiteliális Na^+ -áram arány (ENaR) módszer kifejlesztése.

A TRESK csatorna egyedi szerkezeti arányokkal rendelkezik a háttér K^+ csatornák családján belül. A TRESK intracelluláris hurok régiója (iLoop) sokkal hosszabb, mint az egyéb (pl. TASK vagy TREK) csatornáké. Másrészt viszont az intracelluláris C-terminális régió (iCtr) a TRESK csatornában sokkal rövidebb, mint a többi háttér K^+ csatornában, mindössze 29 aminosav hosszúságú. Ezek a különbségek lényegesnek tűnnek, mert a háttér K^+ csatornák szabályozása mai ismereteink szerint leginkább a hosszú iCtr régión keresztül valósul meg, ide kötődnek szabályozó fehérjék, ez a régió foszforilálódik, stb., viszont az iCtr legnagyobb része a TRESK-ből egyszerűen hiányzik. Ennek megfelelően nem meglepő, hogy az általunk korábban leírt összes szabályozó mechanizmus a TRESK hosszú iLoop régión keresztül érvényesül, és nem az iCtr-en. Felvetődött tehát a kérdés, hogy a rövid iCtr egyáltalán szerepet játszik-e a TRESK működésében. Ennek vizsgálatára számos különböző mutáns TRESK csatorna konstrukciókat hoztunk létre, amelyekben az iCtr-t terveinknek megfelelően módosítottuk. Ezek segítségével közelebb juthattunk az iCtr jelentőségének megértéséhez, azonban nehézséget okozott, hogyan állapítsuk meg a mutáns konstrukciók aktivitását. Erre ugyanis a K^+ -áram hagyományos módszerrel történő mérése csak nagyon korlátozottan alkalmas. A nehézséget az jelenti, hogy egy adott nagyságú K^+ -áram megfelelhet pl. kis számú nagy aktivitású, vagy nagy számú kis aktivitású csatornának is, és ezek között az áram nagyságának ismeretében nem lehet különbséget tenni. A mutációk (pl. az iCtr-ben) megváltoztathatják a csatornák kifejeződését, vagyis a számukat, illetve azok aktivitását is. Ezeket a hatásokat viszont nem lehet csak az áram nagysága alapján szétválasztani. A probléma áthidalására kifejlesztettük az ENaR módszert. Ennél a vizsgált TRESK mutánst epiteliális Na^+ csatornával kapcsoltuk össze molekuláris biológiai módszerekkel, úgy hogy a két csatorna egy fehérje komplexé épült össze. A Na^+ -áram mérése információt szolgáltatott a csatornakomplexek számáról (a Na^+ csatornát nem alakítottuk át, az mindig ugyanolyan volt), és az ugyanabban a sejtben mért K^+ -áram nagysága ehhez viszonyítható. A K^+ - és Na^+ -áramok hányadosa (I_K/I_{Na}) pedig a vizsgált TRESK mutáns aktivitásával arányos.

Az ENaR módszer alkalmazásával olyan adatokhoz jutottunk az iCtr területén módosított TRESK mutánsokat illetően, amelyekhez korábban nem lett volna lehetőségünk, és ezáltal értelmezni tudtuk az iCtr szerepét a csatorna működésében. Az derült ki, hogy az iCtr, habár rövid, mégis meglepően jelentős szerepet játszik a TRESK aktivitásának meghatározásában. Sikertült pl. az iCtr-t olyan mesterséges szekvenciával helyettesítenünk, amely nagyobb ENaR hányadost, vagyis csatorna aktivitást eredményezett, mint bármelyik korábban vizsgált TRESK csatorna változat, maximális élettani aktivációját követően. Eredményeink az iCtr-re irányítják a figyelmet, és felvetik a lehetőségét, hogy az iCtr régió nem csak mutációk esetén, hanem a normális csatorna szabályozás során is komoly szerepet játszhat, ma még nem ismert mechanizmusok célpontjaként.

3. Az *NDFIP1* ubikvitin ligáz adaptor kölcsönhatásba lép a *TRESK*-kel és gátolja a K^+ -áramot. Korábban elsősorban olyan *TRESK* szabályozási mechanizmusokat fedeztünk fel, amelyek közvetlenül a *TRESK* aktivitásra hatnak, vagyis a csatorna zárását vagy nyitását segítik elő. A jelen project-ben viszont leírtunk egy olyan interakciós partnert, az *NDFIP1* ubikvitin ligáz adaptor fehérjét, amely a csatorna számot csökkenti. Ha az *NDFIP1* fehérje megjelenik, akkor ez ubikvitin ligáz (pl. Nedd4) enzimet csábít a *TRESK* csatorna közelségébe, és az pedig megjelöli a csatornát kovalensen kötött ubikvitin egységekkel. Ez a jelölés a csatornán azt eredményezi, hogy a csatorna a lizoszómába irányítódik és lebomlik. Ezáltal tehát az *NDFIP1* a *TRESK* csatorna lebomlását okozza, vagyis a csatorna számot csökkenti és így okozza a háttér K^+ -áram megkisebbedését. Korábban nem volt ismert, hogy a *TRESK* ubikvitinálódik, tehát az újonnan leírt mechanizmus tovább bővíti ismereteinket a csatorna szabályozásáról.

Eredményeinket rangos nemzetközi folyóiratokban közzétettük. Ezek a nyilvános PubMed adatbázisban megtalálhatók, teljes terjedelemben ingyenesen elérhetők és angol nyelven olvashatók.