A hátsó gyöki ganglionban kifejeződő TREK-2 és TRESK két pórusdoménű K^+ csatornák vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Braun Gabriella

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Szentandrássy Norbert, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Zelles Tibor, Ph.D., habilitált egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Benyó Zoltán, Ph.D., az MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kékesi Violetta, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szentesi Péter, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest

2015

1. Tartalomjegyzék

1. TARTALOMJEGYZÉK **2**

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **4**

3. BEVEZETÉS **6**

3.1 A két pórusdoménnal rendelkező háttér kálium csatornák (K_{2P}) általános jellemzői **8**
3.1.1 Felfedezés, nevezéktan, pórusdoménok 8
3.1.2 Sajátos szerkezeti elemek – az extracelluláris ionút (EIP) és a C-terminális régió 10
3.1.3 Elektrofiziológia 13
3.1.4 A K_{2P} csatornák felosztása és fontosabb funkcióik 14
3.1.5 Anesztetikumok és K_{2P} csatornák 16

3.2 A TRESK két pórusdoménnal rendelkező háttér K^+ csatorna **18**
3.2.1 Lokalizáció és egyedi csatorna (single channel) jellemzők 18
3.2.2 Rendhagyó kalciumfüggő szabályozás 20
3.2.3 Farmakológiai sajátosságok 25
3.2.4 A TRESK pontos élettani funkciója még nem ismert 28

3.3 A TREK/TRAAK alcsaládba tartozó K_{2P} csatornák **32**
3.3.1 Jelentős szerkezeti variabilitás, és változatos szöveti előfordulás 32
3.3.2 Mechano- és termoszenzitivitás, pH, lipidek és foszforiláció általi szabályozás .. 34
3.3.3 Funkcionális jelentőség a központi idegrendszerben és számos különböző szervben 38

3.4 A mikrotubulus-affinitás reguláló kináz (MARK, microtubule-associated-protein /microtubule affinity-regulating kinase) **41**

3.5 K^+ áramok a hátsó gyöki ganglion idegsejtjeiben **43**
3.5.1 Feszültségfüggő K^+ csatornák (K_v) 44
3.5.2 Kalcium-aktivált K^+ csatornák 45
3.5.3 Befelé rektifikáló K^+ csatornák (K_{ir}) 46
3.5.4 K_{2P} csatornák 46

3.6 A ruténiumvörös ioncsatornákra és a sejt kalciumháztartására kifejtett hatásai **48**

4. CÉLKITŰZÉSEK **50**

5. MÓDSZEREK **51**

5.1 Felhasznált anyagok, oldatok 51
5.2 Petesejtek preparálása, injektálása 51
5.3 Felnőtt egér DRG preparálása, disszociált neuronkultúra előállítása 52
5.4 Sejtvonalak, sejttenyészetek 53
5.5 Tranziens transzfekció 53
5.6 Két-elektródos voltage clamp mérések 54
5.7 Patch clamp mérések 55

5.8 Plazmidok előállítása 57
5.9 A rekombináns MARK2 fehérje előállítása 59
5.10 In vitro radioaktív foszforiláció 60
5.11 A ruténiumibolya (RV) tisztítása 60
5.12 Statisztikai analízis, dózis-hatás görbeillesztés és korrelációanalízis 61

6. EREDMÉNYEK 62

6.1 A TRESK háttér K^+ csatornát emlős sejtvonalban is aktiválja a kalcineurin 62

6.2 A MARK2 kináz gátolja a TRESK csatornát 68
6.2.1 A TRESK csatorna fő szabályozó régióját foszforiláló kináz azonosítását célzó első kísérletek 68
6.2.2 A Xenopus petesejtben koexpresszált MARK2 kináz és TRESK csatorna vizsgálata 71
6.2.3 A MARK2 kináz hatása a S264E mutáns TRESK csatornára 74
6.2.4 A MARK2 által kifejtett TRESK gátlás rövid időn belül létrejön, és nélkülözhetetlen hozzá a kinázaktivitás 75
6.2.5 A TRESK csatorna és a MARK2 kináz kölcsönhatásának vizsgálata in vitro foszforilációs reakcióban 78
6.2.6 Az AMPK-rokon kináz család tagjainak hatása a TRESK csatornára 81

6.3 A ruténiumvörös hatása a K_{2P} csatornák működésére 84
6.3.1 A K_{2P} csatornák ruténiumvörös érzékenységének átfogó vizsgálata 84
6.3.2 A TREK-1 és TREK-2 csatornák eltérő ruténiumvörös-érzékenységének magyarázata 86
6.3.3 A ruténiumibolya hatékonyabb gátlószere a TRAAK csatornának, mint a ruténiumvörös 90
6.3.4 Ruténiumvörösre érzékeny háttér K^+ áram a hátsó gyöki ganglion idegsejtekben 95

7. MEGBESZÉLÉS 98

7.1 Általános megfontolások 98
7.2 A TRESK aktivációja sejtvonalban 100
7.3 A MARK–TRESK interakció megbeszélése 101
7.4 A ruténiumvörös mint K_{2P} csatorna gátlószer 106

8. KÖVETKEZTETÉSEK 110

9. ÖSSZEFOGLALÁS 112

10. SUMMARY 113

11. IRODALOMJEGYZÉK 114

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 136

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 137

2. Rövidítések jegyzéke

AA	arachidonsav (arachidonic acid)
AKAP150	150 kilodaltonos protein kináz A-t horgonyzó fehérje (**A**-**k**inase-**a**nchoring **p**rotein **150**)
AMP	adenozin-monofoszfát (**a**denosine **m**ono**p**hosphate)
AMPK	**AMP**-aktivált protein **k**ináz
AMPKrk	**AMPK** rokon kináz
AP	**a**kciós **p**otenciál
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BK_{Ca}	magas konduktanciájú Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (**b**ig conductance **ca**lcium-activated **K^+** channel)
DRG	hátsó gyöki ganglion (**d**orsal **r**oot **g**anglion)
EIP	extracelluláris ionút (**e**xtracellular **i**on **p**athway)
ER	**e**ndoplazmatikus **r**etikulum
EC	**e**xtra**c**elluláris
GHK	**G**oldman-**H**odgkin-**K**atz
GPCR	G fehérje kapcsolt receptor (**G p**rotein-**c**oupled **r**eceptor)
GST	**g**lutation-**S**-**t**ranszferáz
h-	humán
HEPES	4-(2-**h**idroxi**e**til)-1-**p**iperazin-**e**tán**s**zulfonsav
IBA	**i**so**b**utylalkenyl **a**mide
IC_{50}	fél-maximális gátló koncentráció (half-maximal **i**nhibitory **c**oncentration)
IK	közepes konduktanciájú Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (**i**ntermediate conductance **ca**lcium-activated **K^+** channel)
$[K^+]$	K^+ ionkoncentráció
kDa	kilodalton
K_{ir}	befelé rektifikáló K^+ csatorna (**i**nwardly **r**ectifying **K^+** channel)
K_v	feszültségfüggő K^+ csatorna (**v**oltage-gated/-dependent **K^+** channel)
K_{2P}	két pórusdoménnal rendelkező K^+ csatorna (two-pore domain K^+ channel)
m-	egér (mouse)
MAP	**m**ikrotubulus **a**sszociált **p**rotein

MARK	**m**icrotubule-associated-protein/microtubule **a**ffinity-**r**egulating **k**inase
NFAT	**n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T**-cells
Ni-NTA	nikkel-nitrilotriecetsav
P	pórusdomén
P_o	nyitvatartási valószínűség (**p**robability of being **o**pen)
PCR	polimeráz láncreakció (**p**olymerase **c**hain **r**eaction)
PDB	fehérjeszerkezeti adatbázis (**P**rotein **D**ata **B**ank)
PKA	**p**rotein **k**ináz **A**
PKC	**p**rotein **k**ináz **C**
PMA	forbol-mirisztil-acetát (**p**horbol 12-**m**yristate 13-**a**cetate)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (**p**henyl**m**ethyl**s**ulfonyl **f**luoride)
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav (**p**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cid)
RR	ruténiumvörös (**r**uthenium **r**ed)
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
RV	ruténiumibolya (**r**uthenium **v**iolet)
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (**s**odium **d**odecyl **s**ulfate **p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis)
SK	alacsony konduktanciájú Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (**s**mall conductance **ca**lcium-activated $\mathbf{K^+}$ channel)
SSRI	szelektív szerotonin visszavétel gátló (**s**elective **s**erotonin **r**euptake **i**nhibitor**)**
TALK	**T**WIK-related **AL**kaline pH-activated $\mathbf{K^+}$ channel
TASK	**T**WIK-related **A**cid-**S**ensitive $\mathbf{K^+}$ channel
THIK	**T**andem pore domain in a **H**alothane-**I**nhibited $\mathbf{K^+}$ channel
TM(S)	**t**ransz**m**embrán (**s**zegmens)
TRAAK	**T**WIK-**R**elated **A**rachidonic **A**cid-activated $\mathbf{K^+}$ channel
TREK	**T**WIK-**RE**lated $\mathbf{K^+}$ channel
TRESK	**T**WIK-**RE**lated **S**pinal cord $\mathbf{K^+}$ channel
TRG	**tr**igeminális **g**anglion
TRP	**t**ranziens **r**eceptor **p**otenciál (ioncsatorna fehérje)
TRPV1	**t**ranziens **r**eceptor **p**otenciál **v**anilloid-**1**
TWIK	**T**andem of pore domains in a **W**eakly **I**nward rectifying $\mathbf{K^+}$ channel

3. Bevezetés

Az olykor fájdalommal is kísért fizikai, kémiai és termális ingerek afferentációjában központi szerepe van a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok (DRG, TRG) szenzoros pszeudounipoláris neuronjainak. Az itt jelenlévő ioncsatornák régóta intenzív vizsgálatok tárgyát képezik, hiszen a fájdalom csillapításának lehetséges célpontjai. A K^+ csatornákon folyó áram következtében kialakuló hiperpolarizáló hatás csökkenti a neuronok ingerlékenységét. Ezért a K^+ áramok stimulálásával a kórosan fokozott ingerlékenységű vagy aktivitású neuronok mintegy „elcsendesíthetők". A munkacsoportunk által vizsgált két pórusdoménnal rendelkező (2P) kálium (K_{2P}) csatornák közül a hátsó gyöki ganglionban a TRESK és a TREK-2 csatornák jelentős mértékben fejeződnek ki, melyek közül a TRESK neuropátiás fájdalomban betöltött lehetséges szerepét több közlemény is taglalja [1-4].

A kálium csatorna szupercsalád tagjai szinte valamennyi sejttípus plazmamembránjában, de egyes sejtorganellumok membránjában is jelen vannak mind az állat-, mind a növényvilágban. A membránpotenciálra és excitábilis sejtekben az ingerlékenységre kifejtett hatásuk révén számos jelátviteli folyamatban szerepelnek, és általános elterjedtségüknek megfelelően számos élettani folyamatban részt vesznek. Működésükben fontos szerkezeti elem a kálium csatorna szelektivitási filter, amely a nagy ionszelektivitásért felelős. A szelektivitási filter gyakorlatilag lehetetlenné teszi K^+ ionoktól eltérő, fiziológiásan jelenlévő ionok átjutását a csatornán (Na^+/K^+ permeabilitási arány 1:1000), és emellett igen nagy intenzitású ionáramlást biztosít (egyes csatornákban akár 10^6-10^8 db ion/sec) [5].

A szelektivitási filter szerkezete a baktériumoktól az emberig minden K^+ csatornában nagy hasonlóságot mutat. A filterre jellemző ún. „signature" szekvencia nagymértékben konzervált: (T/S)XGY(G/L/F) konszenzus szekvenciával jellemezhető, melyben az X helyén tetszőleges aminosav állhat [6]. Ez az aminosav-szekvencia a szelektivitási filter kialakításában meghatározó jelentőségű pórusdomén részét képezi. A pórusdomén N-terminális felé eső része egy extracelluláris (EC) irányból a sejtmembránba nyúló, de azt át nem érő α-hélix. A C-terminális irányban továbbhaladva az α-helikális struktúra megszűnik, és a peptidlánc visszakanyarodik az EC térbe. Ez utóbbi rész foglalja magába – a „signature" szekvenciának megfelelő – legkisebb

csatornaátmérőt képező filter régiót, ahol átjutásuk során a hidrátburkukat átmenetileg elvesztő K^+ ionok kölcsönhatásba lépnek a filtert alkotó aminosavak karbonilcsoportjainak elektronegatív oxigén atomjaival. A kisebb méretű Na^+ ionok hidrátburkának elvesztése és oxigénatomokkal létrejövő kölcsönhatása fiziológiás ionkoncentrációk esetén energetikailag annyira kedvezőtlen, hogy a Na^+ ionok gyakorlatilag nem jutnak át a csatornán [7].

A humán genom közel 80 génje kódol valamilyen K^+ csatorna alegységet [8]. A K^+ csatornák működőképes szelektivitási filterét négy pórusdomén alkotja. A legtöbb csatornában a pórus négy – nem feltétlenül azonos – alegység tetramerizációjával jön létre, amelyben az alegységek egyenként egy-egy pórusdomént tartalmaznak. A K_{2P} csatornák azonban alegységenként két pórusdomént hordoznak, így két alegység dimerizációja hozza létre a funkcióképes csatornát, benne a jellegzetes K^+-ra szelektív filterrel. Négy nagyobb K^+ csatorna családot különíthetünk el szerkezeti és működésbeli sajátosságaik, ill. az alegységeket felépítő transzmembrán α-hélixek száma alapján:

1. ***Feszültségfüggő K^+ csatornák:*** alegységenként hat transzmembrán (TM) szegmenst és egy pórusdomént (6TM/1P) tartalmaznak.
2. ***Kalcium-aktivált K^+ csatornák:*** hat vagy hét TM szegmenst és egy pórusdomént (6TM/1P, 7TM/1P) tartalmazó alegységek (további alcsoportok, ill. újabb felosztások szerint külön családok tartoznak ide).
3. ***Befelé rektifikáló K^+ csatornák:*** két TM szegmenst és egy pórusdomént (2TM/1P) tartalmazó alegységek.
4. ***K_{2P} – két pórusdoménnal rendelkező – K^+ csatornák:*** négy TM szegmenst és két pórusdomént (4TM/2P) tartalmazó alegységek.

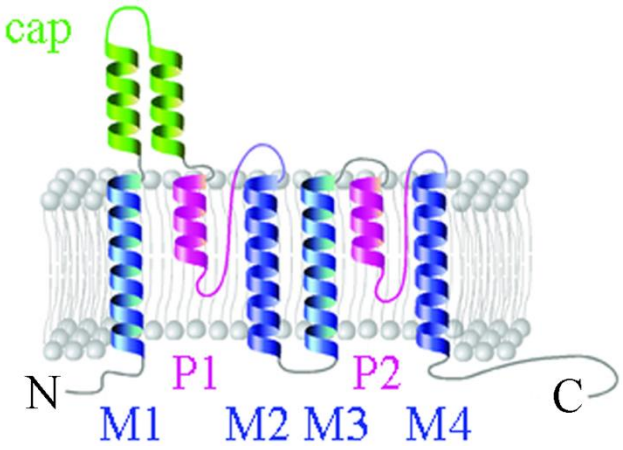
Mivel munkám során különböző K_{2P} csatornák működését vizsgáltam, a továbbiakban áttekintem ezek általános tulajdonságait és jelentőségét.

3.1 A két pórusdoménnal rendelkező háttér kálium csatornák (K_{2P}) általános jellemzői

3.1.1 Felfedezés, nevezéktan, pórusdoménok

A plazmamembrán magas nyugalmi K^+ permeabilitása már a múlt század derekán, az elektrofiziológia hajnalán ismert volt [9-10], mégis fél évszázadnak kellett eltelnie az első K_{2P} csatorna felfedezéséig [11]. Az ún. háttér vagy szivárgó ('leak') K^+ áramért felelős tandem (egy alegységen belül egymás után elhelyezkedő kettő) pórusdoménnal (P) rendelkező K_{2P} csatornáknak [12] jellegzetes a membrántopológiája (1. ábra). A K_{2P} csatornákat felépítő homo- vagy heterodimerek alegységei négy TM szegmenst és két pórusdoményt tartalmaznak az első és második, valamint a harmadik és negyedik TMS között (4TM/2P). Így ebben az esetben is négy pórusdomén hozza létre a működőképes szelektivitási filtert, mint valamennyi K^+ csatorna esetén.

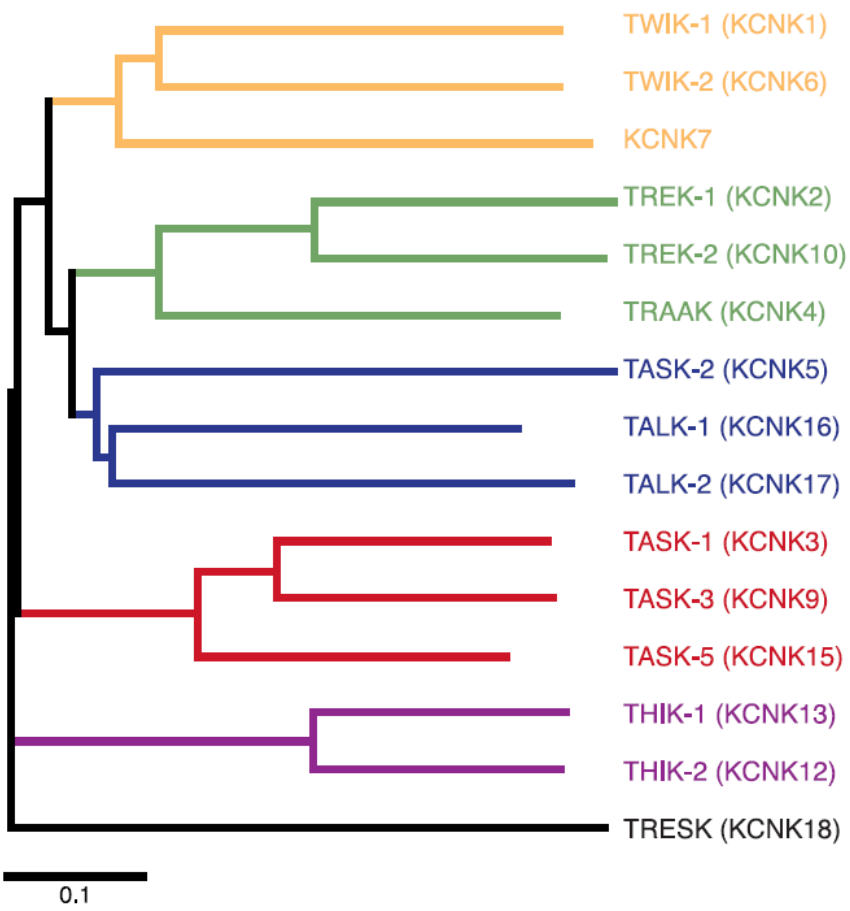
K_{2P} csatornák nem csak emlősökben találhatók meg; 4TM/2P szerkezetű csatornát kódoló géneket alacsonyabb rendű organizmusokban is leírtak, mint például az ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*), a *Caenorhabditis elegans* fonalféregben és számos növényfajban [13-16].



1. ábra: A K_{2P} csatornák membrántopológiája. *M1, M2, M3, M4*: transzmembrán doménok; *P1, P2*: pórusdoménok; *cap*: első extracelluláris hurok által alkotott ún. sapka domén; N: N-terminális; C: C-terminális. (Módosítva a [17]. referencia közlemény anyagából.)

Emlősökben a K_{2P} családnak 15 különböző alegységet kódoló tagja ismert, melyeket szekvenciabeli és funkcionális hasonlóságuk alapján hat alosztályba sorolunk (2. ábra). Ezen alosztályok, a TWIK, TREK, TALK, TASK, THIK és TRESK közötti szekvencia-eltérések majdnem elérik más K^+ csatorna családok (pl. feszültségfüggő és befelé rektifikáló) közötti különbséget. Tehát a K_{2P} csatornák némely tulajdonságukban egyező, de igen változatos csoportját alkotják a K^+ csatornáknak [12].

A K_{2P} csatornákra a Human Genom Organization (HUGO) elfogadott egy szisztematikus nevezéktant, melyben a géneket (KCNK1-18) és az általuk kódolt csatornafehérjéket (K_{2P}1-18) a felfedezés sorrendjének többé-kevésbé megfelelő számokkal különböztetik meg (nincs 8-as, 11-es és 14-es sorszámú, így adódik összesen 15), a szakirodalomban mégis inkább a hagyományos elnevezések terjedtek el. Ezt a szokást ebben a munkában is követem, de első említéskor zárójelben feltüntetem a HUGO nómenklatúra szerinti nevet is.



2. ábra: A K_{2P} csatornák filogenetikai fája.
(Módosítva a [12]. referencia közlemény anyagából.)

A K_{2P} csatornák P1 (első pórusdomén) motívumában többnyire a K^+ csatorna „signature” szekvencia legelterjedtebb GYG motívuma található, míg a P2-ben (második pórusdomén) általában GFG. A TREK-1 ($K_{2P}2$), THIK-1 ($K_{2P}13$) és THIK-2 ($K_{2P}12$) alegységek mindkét pórusdoménjában GFG található, míg a TASK-5 ($K_{2P}15$) P1-ében EYG. A TWIK-1 ($K_{2P}1$) és TWIK-2 ($K_{2P}6$) alegységekben a P2-ben GLG található.

Néhány K_{2P} csatorna alegység nem vagy kevéssé expresszálható heterológ rendszerben, illetve áramát nem lehet megnyugtató módon kimutatni natív sejtekben. Ide tartozik az elsőként klónozott TWIK-1, és közeli rokona, a TWIK-2, illetve a szintén TWIK alcsaládba tartozó, csendes alegységet kódoló KCNK7. A humán KCNK7 a második pórusdoménban GL*E* aminosavakat kódol (az egér ortológban a konszenzusnak megfelelő GLG szekvencia található). Ez felveti a kérdést, hogy a (humán) KCNK7 által kódolt protein valóban K^+ csatornaként funkcionál-e, hiszen az intakt „signature” szekvenciát a szelektivitási filter nélkülözhetetlen elemének tekintik. Mindazonáltal a KCNK7 által kódolt mRNS a központi idegrendszer számos helyén megtalálható [18-19].

A TASK alcsaládba tartozó TASK-5 szintén csendes, bár mRNS-ét számos helyen (mellékvesekéreg, hallóközpont, szív) kimutatták, heterológ expressziója nem eredményez K^+ áramot [20]. Szintén nem ad áramot a THIK-2 expressziója, azonban ez az alegység heterodimert képezhet az egyébként homodimerként is funkcióképes THIK-1 alegységgel [21].

3.1.2 Sajátos szerkezeti elemek – az extracelluláris ionút (EIP) és a C-terminális régió

A K_{2P} csatornák többségében az intracellulárisan elhelyezkedő N-terminális rövid, a TASK csatornákban dibázisos, endoplazmás retikulum retenciós szignált tartalmaz, és a csatorna lokalizációját szabályozza. A sejten belüli C-terminális régió a legtöbb K_{2P} csatornában alapvetően fontos, szinte minden szabályozó tényező ide konvergál, kivéve az EC ható pH, ill. ionok általi gátlást (ld. alább). A K_{2P} csatornákban a TMS1 és az első pórusdomén (P1) közötti extracelluláris hurok hosszú (ld. 1. ábra).

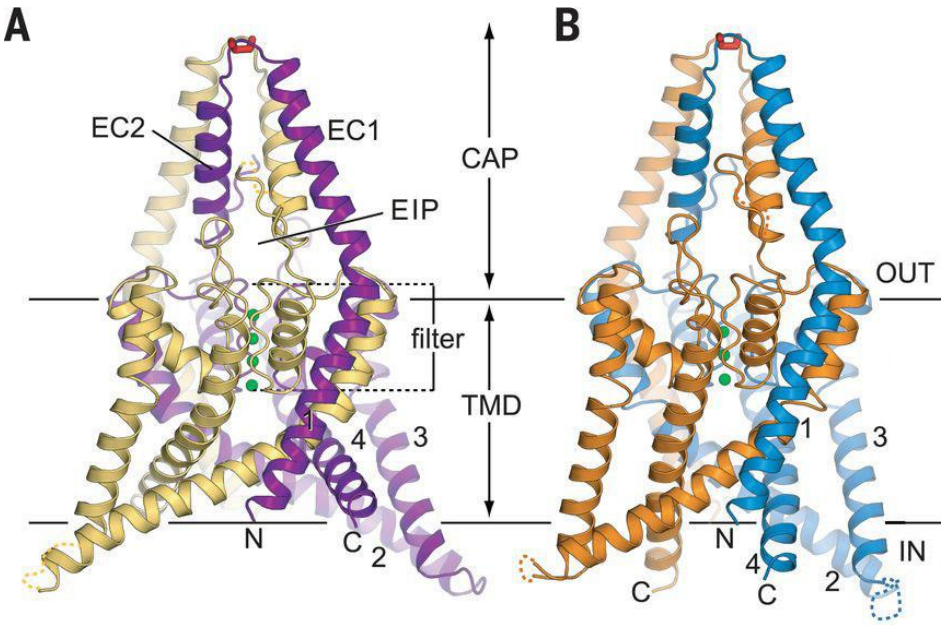
Ez utóbbi, hozzávetőlegesen 60 aminosavnyi szakasz a legtöbb esetben nélkülözhetetlen az alegységek dimerizációjához, melyhez az egyes csatornákban itt található cisztein (Cys) aminosavak között kialakuló diszulfidhíd hozzájárulhat. A közelmúltban a humán K_{2P} csatornák közül a TWIK-1, TREK-1, TREK-2 és TRAAK csatornák kristályszerkezetét nagy pontossággal meghatározták (TWIK-1 − fehérjeszerkezeti adatbázis (Protein Data Bank, PDB): 3UKM; TREK-1 − PDB: 4TWK; TREK-2 − PDB: 4BW5; TRAAK − PDB: 3UM7 és 4I9W) [22-25]. Ez számos, az extracelluláris hurkot is érintő strukturális kérdésre adott választ (3./A ábra).

A két alegység extracelluláris hurokrégiója alkotja az ún. *cap* (sapka) domént, melynek belsejében a membrán felületével párhuzamosan fut az 'extracelluláris ionút' (extracellular ion pathway, EIP). A pórus ennek a járatnak a középpontjából nyílik, a járattal együtt mintegy T-betű alakzatban, ahol a T vízszintes része az EIP-nek, a függőleges pedig a csatorna pórusának felel meg. Ez a szerkezet nagymértékben meghatározza, hogy méret, ill. töltés alapján milyen molekulák férnek egyáltalán hozzá a pórus nyílásához. Ez magyarázhatja, hogy a K_{2P} csatornák miért érzéketlenek számos klasszikus K^+ csatorna gátlószerrel szemben. Az EIP azonban egyes molekulák, farmakonok interakciós partnere is lehet, mint ahogy a TASK csatorna esetében az extracelluláris protonok az itt található hisztidin (His) aminosavakon keresztül szabályozzák az áramot [26].

A hosszú C-terminális struktúrát a kristályszerkezet-meghatározás általában nem ábrázolja, azonban funkcionális vizsgálatokból szerteágazó és részletes ismereteink vannak ennek a régiónak a csatorna-aktivitás szabályozásában betöltött szerepéről több K_{2P} alegység esetében is [27-28]. A TASK-1 és -3 csatornák proximális C-terminális szakasza hozzájárul a jellemző gátlási folyamathoz, melyet a G_q fehérjéhez kapcsolt receptorok ingerlése vált ki. Érdekes módon a teljesen függetlennek tűnő farmakológiai aktiváló hatás kialakulásához, melyet a párolgó folyadék anesztetikumok fejtenek ki a TASK csatornákon, szintén szükséges az intakt C-terminális [27]. A TREK csatornák esetén a membránközeli C-terminálison konvergáló szabályozó hatások még nagyobb változatosságot mutatnak. A TREK csatornák C-terminálisa szerepet játszik a többszörösen telítetlen zsírsavak, például arachidonsav erőteljes serkentő hatásában [29-30], csakúgy, mint a csatornák jellemző mechano- és termoszenzitivitásában [28;31-32]. Mindemellett ebben a régióban találhatók a protein kináz A és C által foszforilált,

csatorna-aktivitást szabályozó szerin aminosav-oldalláncok [33], és a csatorna intracelluláris pH iránti érzékenységéért felelős protonszenzor régió is [28;30;34].

Aránylag keveset tudunk arról, hogy a rendkívül változatos szabályozó hatások hogyan tevődnek át a csatorna kapuzásért felelős szerkezeti elemeire. A K_{2P} csatornák esetén a kapuzás mechanizmusát a közelmúltban kezdték intenzíven vizsgálni. Valószínűleg szerepet játszik a kapuzásban a szelektivitási filter régió szerkezetének konformációváltozása (ún. C-típusú kapuzás), vagyis az amúgy is legszűkebb pórusszakasz átjárhatósága változik meg a K^+ számára [35]. Egy másik, számos egyéb K^+ csatornákra is jellemző kapuzási mechanizmus lehet egyes transzmembrán hélixek csuklószerű mozgása, meghajlása az aminosav-szekvenciában konzervált glicinek területén ("glycine hinges") [25;36].



3. ábra: A humán TREK-2 két konformációjának kristályszerkezete.

(A) Az ún. felső állású konformáció szalagreprezentációban, a 3,4 Å felbontású kristályszerkezet meghatározás alapján. Ez felel meg a nyitott konformációnak. Sárga és lila alegységek, a filterben négy K^+ ion található. **(B)** Az ún. alsó állású (zárt) konformáció. Narancssárga és kék alegységek, a filterben csak három K^+ ion helyezkedik el. *OUT*: extracelluláris tér; *IN*: intracelluláris tér; *TMD*: transzmembrán domén (1, 2, 3, 4); *N/C*: N- és C-terminális; *EC1/EC2*: a két alegység hosszú EC hélixe az 1. extracelluláris hurokrégióban; *EIP*: extracelluláris ionút (extracellular ion pathway). A K^+ ionok zöldek, a két alegység közötti diszulfid híd piros. (Módosítva a [25]. referencia közlemény anyagából.)

Ez a mechanizmus a pórus intracelluláris szájadékához közel tesz lehetővé szűkülést vagy tágulást (3./B ábra.), illetve esetleg kapcsolt lehet a szelektivitási filterben történő kapuzási eseményekhez is.

3.1.3 Elektrofiziológia

A K_{2P} csatornák nemcsak szerkezetükben, de elektrofiziológiájukban is sok hasonlóságot mutatnak. Ellentétben a többi K^+ csatornával, a K_{2P} csatornák árama közelítőleg megfelel a háttér K^+ áram Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) áramegyenlet által leírt tulajdonságainak. Mégsem tekinthetők azonban passzív, K^+-szelektív pórusoknak. Működésüket számos (membránpotenciáltól független) fizikokémiai paraméter és sejtszignalizációs útvonal befolyásolja. A K_{2P} csatornák nyitvatartási valószínűsége (P_o; probability of opening) a membránpotenciáltól kevéssé függ, vagy attól független, így áramuk nagyjából megfelel az ideális háttér áramnak.

Mivel a K_{2P} csatornák gyakorlatilag membránpotenciáltól függetlenül aktívak, így érthető, hogy mind a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában, mind a repolarizációban szerepet játszanak. Emellett a háttér áram „időfüggetlen” olyan értelemben, hogy áramamplitúdója szinte azonnal (szub-milliszekundumos késéssel) követi a membránpotenciál változásait. Ez lényegesen eltér például a feszültségfüggő K^+ csatornáktól, mivel a feszültségfüggő áramok esetén jóval hosszabb (legalább milliszekundumos nagyságrendű) késéssel követi a feszültségváltozást a jellegzetes áramamplitúdó változás (feszültségfüggő aktiváció, inaktiváció). A feszültségfüggő csatornáknál a P_o nem független a membránpotenciáltól, és a P_o feszültségfüggésének hátterében aránylag lassú fehérjekonformáció-változások állnak. A TWIK-2 kivételével, mely inaktiválódó K^+ áramot hoz létre, a háttér K^+ csatornák aktivációs, deaktivációs, illetve inaktivációs kinetikát nem (vagy alig) mutatnak. Tehát egy háttér áram négyszögjelszerű feszültségváltozásra jó közelítéssel szintén négyszögjelszerű áramváltozással reagál, gyakorlatilag elhanyagolható késéssel.

Az ideális háttér K^+ áram további sajátossága, hogy nem mutatható ki rektifikáció, tehát azonos nagyságú, de ellentétes előjelű hajtóerő (elektrokémiai grádiens) azonos amplitúdójú, ellentétes előjelű áramot eredményez. A fiziológiás

körülmények között tapasztalható rektifikáció tehát látszólagos, az eltérő extra- és intracelluláris K^+ koncentrációk következménye. Az ideális háttér K^+ áramtól eltérően a K_{2P} csatornák közül egyesek gyenge feszültségfüggést mutatnak, és némelyek enyhén rektifikálnak is, azonban sokkal kisebb mértékben, mint a többi K^+ csatorna család egyes képviselői. Az ideálistól való kis eltérésektől eltekintve kijelenthetjük, hogy a K_{2P} csatornákon háttér (csurgó, leak) K^+ áram folyik.

3.1.4 A K_{2P} csatornák felosztása és fontosabb funkcióik

Elsőként a TWIK-1 (**T**andem of pore domains in a **W**eakly **I**nward rectifying $\mathbf{K^+}$ channel, K_{2P}1.1; KCNK1) csatornát klónozták meg [11]. A TWIK alosztályba soroljuk még a TWIK-2 (K_{2P}6.1; KCNK6) [37] és a már említett KCNK7 (K_{2P}7.1; KCNK7) által kódolt pórusképző alegységeket is, bár ez utóbbi csatorna heterológ expressziója nem eredményez K^+ áramot [19]. Igazából a TWIK csatornák expressziója is bizonytalan. Az irodalmi adatokkal összhangban laboratóriumunkban nem tudtunk TWIK-1 áramot mérni *Xenopus laevis* (afrikai karmosbéka) petesejteken, és a TWIK-2 kifejezése is csak nagyon kis amplitúdójú áramot eredményezett. A TWIK-1 áramot leíró munkacsoport eredményei szerint az áram gyengén befelé rektifikál, valamint a csatorna működését az intracelluláris pH csökkenése gátolja, míg a protein kináz C általi foszforiláció serkenti [11;38]. A TWIK-1 homodimert képez, és jelenlétét kimutatták többek között szívben, vesében, tüdőben, valamint a halló és vesztibuláris rendszerben [39-40]. Többféle tumoros megbetegedésben a TWIK-1 downregulációját figyelték meg, illetve hogy a KCNK1 gén egy p53 tumor szupresszor családba tartozó fehérje általi transzaktivációja tumor növekedést gátló hatású [41].

A TREK-1 (**T**WIK-**RE**lated $\mathbf{K^+}$ channel; K_{2P}2.1; KCNK2) [42], TREK-2 (K_{2P}10.1; KCNK10) [43;44] és TRAAK (**T**WIK-**R**elated **A**rachidonic **A**cid stimulated $\mathbf{K^+}$ channel; K_{2P}4.1; KCNK4) [45] mechanoszenzitív K^+ csatornák a TREK alosztály tagjai. A központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben egyaránt széles körben kifejeződnek, és a leggyakrabban vizsgált K_{2P} csatornák közzé tartoznak. Mivel a dolgozatban bemutatott munkámban fontos szerepet játszanak, ezt az alcsaládot külön fejezetben ismertetem (ld. 3.3).

Számos K_{2P} csatorna működését befolyásolja az extra- és intracelluláris pH, melyek közül a TASK és TALK alosztály tagjai kifejezetten érzékenyek az EC tér kémhatásának változásaira. A TASK (**T**WIK-related **A**cid-**S**ensitive **K**$^+$ channel) alosztály tagjai a TASK-1 (régebbi nevén TASK, K_{2P}3.1; KCNK3) [46-47] és TASK-3 (K_{2P}9.1; KCNK9) [26;48] kifejezetten érzékenyek az EC pH-ra, a savanyodás esetükben gátló hatású. Bár a TASK-3 kevésbé érzékeny a pH csökkenésre, mint a TASK-1, mindkét csatornában az EC hurkon elhelyezkedő 98-as pozíciójú hisztidin protonálódása közvetíti a pH-érzékenységet [26]. Ez a hisztidin a TASK-5 (K_{2P}5.1; KCNK15) [20] EC hurokrégióján is megtalálható, tehát konzervált a TASK alcsaládon belül. A mellékvesekéregben, ahol a TASK-1 és TASK-3 funkcionális jelentőségét munkacsoportunk és mások kimutatták [49-51], a csendes TASK-5 is nagy mennyiségben expresszálódik [20].

A K^+ csatorna alegységek körében gyakran előforduló heteromerizáció jelentősen növeli a natív sejtek K^+ áramainak sokféleségét. Munkacsoportunk elsőként írta le 2002-ben, hogy a TASK-1 és TASK-3 alegységek működő heterodimert képeznek [52]. A közelmúltban mások azt találták, hogy a TASK-1/TASK-3 csatornán kívül más K_{2P} alegységek is heterodimert képezhetnek, így a THIK-1/THIK-2 csatorna is működőképes. A TASK-1/TASK-3 heterodimert számos élettani szempontból fontos területen azonosították in vivo, mint például kisagyi szemcsesejtben, motoneuronokban és a glomus caroticum kemoszenzitív O_2 érzékelő sejtjeiben [53-55].

A TALK (**T**WIK-related **AL**kaline pH-activated **K**$^+$ channel) alosztályba a TALK-1 (K_{2P}16.1; KCNK16) [56], TALK-2 (más néven TASK-4, K_{2P}17.1; KCNK17) [56-57] és TASK-2 (K_{2P}5.1; KCNK5) [58] csatornák tartoznak. Ahogy elnevezésük is utal rá, a TALK csatornák árama az EC tér alkalikus pH tartományában aktiválódik. Ez a TASK-2 esetén is igaz, habár a TASK-2 csatornát végül nem keresztelték át TALK-3-má, annak ellenére, hogy aminosav-szekvenciája és tulajdonságai alapján egyértelműen a TALK alosztályba tartozik. A TALK csatornák mRNS-e főként az exokrin pancreasban mutatható ki, de a TASK-2 az endokrin részben is jelen van [56-57;59]. Elsősorban a pancreas bikarbonát szekréciójában működnek közre, valamint a TASK-2 a vese proximális tubulusainak bikarbonát reabszorbciójában, és patkányban a tüdőartéria simaizomzatának ingerlékenységében is fontos szereppel bír [60-62].

Ezenkívül a TALK-1 és TALK-2 NO (nitrogén-monoxid) és ROS (reaktív oxigén származékok) hatására is jelentősen aktiválódik [56;59;63].

Számos tandem pórusdoménű K^+ csatorna aktiválódik halotán hatására (lásd a következő alfejezetet), míg a THIK (**T**andem pore domain **H**alothane **I**nhibited K^+ channel) alosztályba tartozó, arachidonsavval aktiválható THIK-1 (K_{2P}13.1; KCNK13) és a THIK-2 (K_{2P}12.1; KCNK12) csatornák gátlódnak [64]. A THIK-2 heterológ expressziója nem eredményez mérhető K^+ áramot, mivel az N-terminális régiójában található arginin gazdag motívum ER retenciós szignálként működik, és nagyon alacsony a plazmamembránba kijutó csatornák száma [64]. Azonban az ER retenciós szignál delétiója a membránba is kijutó, működőképes csatornákat eredményez [21;65-66], amelyen a halotán-érzékenység mérhető.

Az utolsóként megismert K_{2P} csatorna családba egyetlen csatorna alegység, a TRESK (**T**WIK-**RE**lated **S**pinal cord **K**$^+$ channel) tartozik [67-69], amely jelentősen eltér a többi K_{2P} csatornától. Munkacsoportunk az elsők között klónozta a csatorna cDNS-ét, és a TRESK azóta is figyelmünk előterében áll. Mivel Ph.D. munkám jelentős részben a TRESK szabályozásának vizsgálatára épül, ezért e csatorna tulajdonságait külön fejezetben részletesen tárgyalom (ld. 3.2).

3.1.5 Anesztetikumok és K_{2P} csatornák

A párolgó inhalációs anesztetikumok számos K_{2P} csatorna működését befolyásolják [27;70-72], és több kísérleti adat is utal arra, hogy ez a hatás fontos része az adott szer farmakológiájának. A TREK-1 és a TREK-2 kifejezetten aktiválódik számos ilyen anesztetikum, így a kloroform, éter, halotán, izoflurán és szevoflurán hatására [70]. A TASK-1 áramot csak a halotán, izoflurán és szevoflurán serkenti, az éter gátolja [71]. A hasonló szerkezetű TASK-3 szintén aktiválódik több inhalációs anesztetikum hatására is [73]. Ezzel szemben a TRAAK teljes mértékben rezisztens az anesztetikumokra.

A TREK-1 csatornát a párolgó folyadék anesztetikumokon kívül további, eltérő szerkezetű (klorál-hidrát), illetve gáz anesztetikumok (pl. xenon, N_2O, ciklopropán) is aktiválják [74-75], szemben a TASK csatornákkal. A TRESK áramot jelentős fajok közötti eltérésekkel ugyan, de szintén serkentik az inhalációs anesztetikumok. A humán

TRESK jelentősen aktiválódik halotán, izoflurán, szevoflurán és dezflurán hatására, míg a rágcsálók TRESK csatornái a humán ortológhoz képest izofluránra kevésbé érzékenyek [76]. A lokálanesztetikumok (pl. lidokain, benzokain, bupivakain) magas koncentrációja viszont gátolja a legtöbb K_{2P} csatornát.

Bizonyítottnak tekinthető, hogy a TREK-1 és TASK csatornák hozzájárulnak az inhalációs anesztetikumok in vivo megfigyelhető hatásaihoz. TREK-1 deficiens (knock out) egérben csökkent a kloroformra, halotánra és más inhalációs anesztetikumokra adott válasz. A vad típushoz képest a TREK-1 knock out állatban megnövekedett az anesztetikumok minimálisan szükséges alveoláris koncentrációja (MAC), mely az egyedek 50%-ában megakadályozza a fájdalmas inger hatására kialakuló motoros választ [77]. A TASK-1 és -3 csatornák szerepe az általános anesztéziában kevésbé szembetűnő, azonban kétségtelenül hozzájárulnak az inhalációs anesztetikumok immobilizáló hatásához a motoneuronok hiperpolarizációjával [72].

3.2 A TRESK két pórusdoménnal rendelkező háttér K^+ csatorna

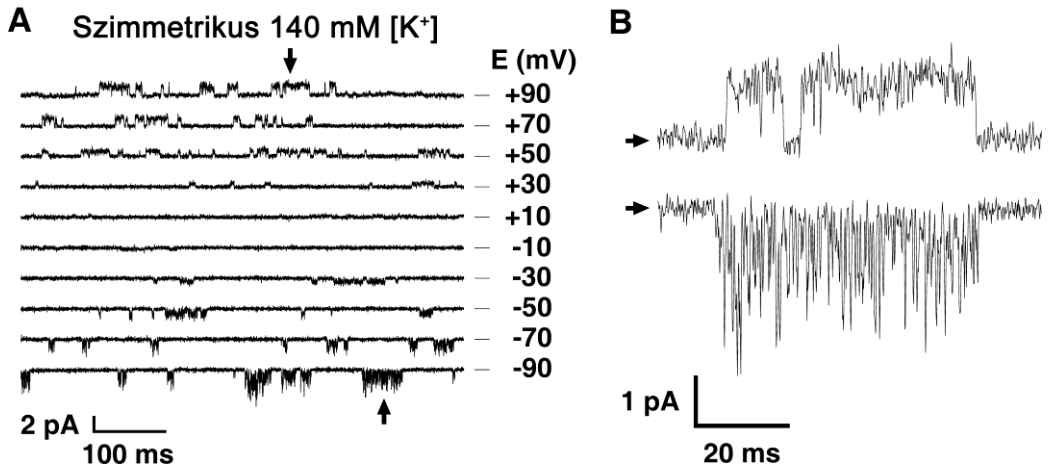
3.2.1 Lokalizáció és egyedi csatorna (single channel) jellemzők

A TRESK (**T**WIK-**Re**lated **S**pinal Cord K^+ Channel; $K_{2P}18.1$; KCNK18) a két pórusdoménű K^+ csatornák utolsóként (2003-ban) felfedezett tagja, a TRESK alosztály egyedüli képviselője. Elsőként humán gerincvelőből [67], majd rövid időn belül egér kisagyból [68] és heréből [69] klónozták meg az ekkor már elérhető humán genom adatbázisban felismert kódoló szekvenciája alapján. Mivel az egér és a humán TRESK csatorna aminosav-szekvenciája csak kis mértékben (65%-ban) identikus, az egyik korai tanulmányban az egér csatornát a TRESK-2 névvel illették [69]. Arra való tekintettel azonban, hogy a genom fajonként csak egy TRESK gént tartalmaz, a későbbiekben a kiegészítő szám nélküli TRESK elnevezés vált elfogadottá a jelentős fajok közti különbségek ellenére. Azonban a különböző ortológok szekvenciája egyes szakaszokon – a pórusdoménok, a TM szegmensek és az intracelluláris hurok C-terminális felé eső részében, ahol a szabályozásban esszenciális foszforiláció/defoszforiláció végbemegy – nagy hasonlóságot mutat.

A TRESK csatorna nem csak emlősökben, hanem alacsonyabb rendű gerincesekben (pl. a zebrahalban, *Danio rerio*) is megtalálható, ebben az értelemben ősi fehérjének tekinthető. A humán TRESK alegység 384 aminosavból áll (az egér és patkány TRESK alegységek 394, ill. 405 aminosavat tartalmaznak), és két alegység összekapcsolódva (homodimerként) alkot működőképes csatornát. A felfedezést követően a TRESK mRNS-ét RT-PCR-rel, valamint a csatornafehérjét immunhiszto- és immuncitokémiai módszerekkel (poliklonális ellenanyagokat alkalmazva) az idegrendszer számos területén kimutatták. Azonosították az agykéregben, a kisagyban, az agytörzsben, a hátsó gyöki és trigeminális érző, illetve egyes autonóm ganglionokban [68;76;78-80], valamint a lépben, thymusban, herében, tüdőben és a szívben [68;69;81]. Így a TRE*S*K (TWIK-Related *Spinal* Cord K^+ Channel) elnevezés kevésbé fedi a csatorna valós lokalizációját, legalábbis rágcsálók esetén, mivel az agykéregben kimutatható TRESK mRNS mennyisége többszöröse a gerincvelőének, és még ennél is magasabb a hátsó gyöki (DRG, dorsal root ganglion) és a trigeminális ganglionokban [81].

A TRESK aminosav-szekvenciája a többi K_{2P} csatornáéval összevetve jelentős eltérést mutat, mindössze 19% aminosav szinten az azonosság [67]. A K_{2P} csatornákra általánosan jellemző 4TMS/2P szerkezetet és az extracelluláris *cap* (sapka) domént kivéve, a TRESK számos szerkezeti és funkcionális sajátosságában is különbözik a többi K_{2P} csatornától. Feltűnően hosszú (több mint 120 aminosav) a második és harmadik TM szegmensek között található intracelluláris hurok. Ez a szakasz a csatorna szabályozásában fontos szerepet játszik. A többi K_{2P} csatorna esetén ez a hurok rövid (nem hosszabb 30 aminosavnál), viszont a C-terminális farokrész viszonylag hosszú (akár 120 aminosavnyi), szemben a TRESK rövid C-terminálisával.

Az egér TRESK egyedi csatorna (single channel) mérések során szimmetrikus (140 mM) K^+ koncentrációjú oldatban is aszimmetrikus megnyílások figyelhetők meg (4. ábra). A sejtből kifelé irányuló áram esetében a megnyílások akár 50 ms hosszúak is lehetnek, ilyenkor a csatorna vezetőképessége 12-13 pS-nek adódik, míg a befelé irányuló 16 pS-es konduktanciájú megnyílások igen rövidek (0,5 ms), de gyakran több 10 ms-ig tartó sorozatban követik egymást [68-69]. Ezek a jellegzetes egyedi csatornamegnyílások lehetővé teszik a TRESK azonosítását natív sejtekből kivágott membránfoltokban.

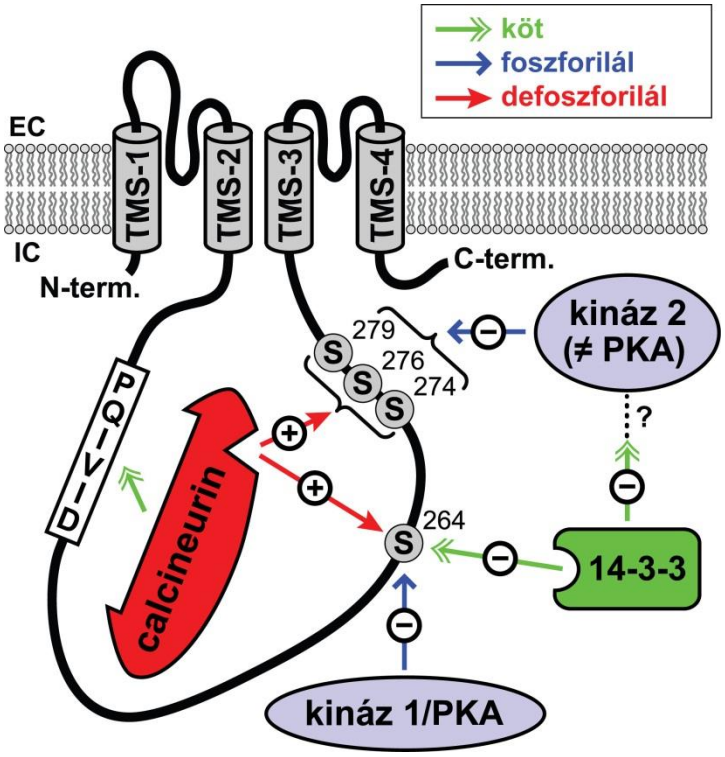


4. ábra: A TRESK aszimmetrikus egyedi csatorna működése.
(A) Egyedi csatorna (single channel) megnyílások egér TRESK-et kifejező *Xenopus* petesejt membránjából kivágott (inside-out) foltban különböző feszültségértékeken. **(B)** Az A panelen fekete nyilakkal jelölt, +90 mV-on (felső regisztrátum), illetve -90 mV-on (alsó regisztrátum) mért események felnagyítva. A sejt eredeti membránorientációját tekintetbe véve a kifelé irányuló áram (+90 mV) négyszögjel-szerű, míg a befelé irányuló áram jelentős "nyitott csatorna zajt" mutat, más megfogalmazásban igen gyorsan ingadozik a nyitott és zárt állapota között. (Módosítva a [68]. referencia közlemény anyagából.)

3.2.2 Rendhagyó kalciumfüggő szabályozás

A TRESK működésének szabályozása a tekintetben egyedi, hogy az intracelluláris kalciumszint emelkedése aktiválja a TRESK áramot, míg a többi K_{2P} csatornát a kalciumjelet kiváltó szignálok nem befolyásolják vagy gátolják (TASK-1, TASK-3, TREK-2) [44;49;68;82-83]. A TRESK szabályozás – az ioncsatornák világában egyedülálló – módjának fő elemeit munkacsoportunk korábban írta le. A G_q-fehérje-kapcsolt receptorok (GPCR) aktiválódását követően a *Xenopus* petesejt heterológ expressziós rendszerben kifejezett humán és egér TRESK áram igen gyorsan a többszörösére nő [68]. A kalciumtranziens kifejlődését megakadályozó kelátor EGTA (etilén-glikol-bis(2-aminoetiléter)-tetraecetsav) petesejtbe injektálása teljes mértékben meggátolja a TRESK áram GPCR ingerlést követő markáns aktivációját, e folyamatban tehát a kalciumjel nélkülözhetetlen. A Ca^{2+}-jel receptor aktiváció nélküli, különböző módszerekkel történő létrehozása, inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) vagy pufferelt Ca^{2+} petesejtbe való injektálásával, illetve a kalcium ionofór alkalmazása a TRESK áram nagyfokú aktivációját eredményezi. A későbbiekben a TRESK kalciumjelre bekövetkező (pontosabban G_q-fehérje-kapcsolt receptoringerlést követő) aktivációját emlős sejtvonalban expresszált csatorna esetében is kimutatta egy másik munkacsoport [78;84], habár kísérleteik során csak igen kisfokú (42% és 82%, vagyis kevesebb mint kétszeres) áramnövekedést tapasztaltak.

Az aktiváció jellegzetessége, hogy a kalciumjel lecsengését követően a TRESK áram csak lassan, akár fél órát is meghaladó idő múlva tér vissza a nyugalmi, kiindulási szintre. Ez a Ca^{2+}-jel közvetett szerepére utal, amit munkacsoportunk meg is erősített [68]. Kivágott plazmamembrán darab („inside-out excised patch”; a membránfolt eredeti belső oldala az extracelluláris oldat felé „néz”) konfigurációban magasabb Ca^{2+} koncentrációjú oldatot adva nem változik a TRESK egyedi csatorna aktivitása. Tehát a Ca^{2+}-jel nem közvetlenül szabályoz, hanem valamilyen intracelluláris mediátor közvetíti hatását a csatorna felé, aktiválva azt. Farmakológiai megközelítést alkalmazva *Xenopus* petesejtben, a kalcium−kalmodulin-függő szerin/treonin foszfatáz kalcineurin (CN) gátlószerei, a ciklosporin A és az FK506 (tacrolimus) teljes mértékben megakadályozzák a TRESK áram aktivációját.



5. ábra: Sematikus reprezentáció az egér TRESK csatorna alegység szabályozásáról. (Módosítva a [85]. referencia közlemény anyagából.)

A kalcineurin szerepét közvetlenül is megerősítettük: a konstitutívan aktív protein foszfatázt koexpresszálva, vagy magát az aktív fehérjét a petesejtbe mikroinjektálva a TRESK áram Ca^{2+}-jel hiányában is aktiválódik.

Tehát a TRESK áram aktivátora a kalcium−kalmodulin-függő szerin/treonin foszfatáz kalcineurin, melynek a TRESK csatornán belül szóba jöhető szubsztrátjai az intracelluláris foszforilált szerin (Ser) és treonin (Thr) oldalláncok (5. ábra). Ennek pontos feltérképezése alanin-pásztázó mutagenezissel történt, csoportonként, ill. szükség esetén egyenként lecserélve a szóban forgó Ser és Thr oldalláncokat alaninra (Ala). Az egér TRESK csatorna aktiválását eredményező kalcineurin általi defoszforiláció a szerin 276-os oldalláncot (Ser 276) érinti elsősorban. A Ser 276-os oldallánc defoszforilált (tehát aktivált) állapotának a helyettesítésére alkalmas Ser276Ala mutáns TRESK csatorna (TRESK-S276A) alapárama ugyanis jóval magasabb, míg Ca^{2+}-jelre bekövetkező aktivációja jelentősen kisebb a vad típusú csatornáénál. A Ser 276-os oldallánc foszforilált (tehát nyugalmi, gátolt) állapotát utánzó Ser276Glu mutáns TRESK csatorna (TRESK-S276E) alapárama kisebb a vad típusú TRESK-hez képest, és a TRESK-S276A mutánshoz hasonlóan Ca^{2+}-jelre csak

csökkent mértékben reagál. Ez a kisfokú "megmaradt" áramnövekedés azonban az aktivációban részt vevő, további foszforilált Ser és Thr oldalláncok létezését sugallja. Sikerült is másik három Ser aminosav-oldalláncot azonosítani, így az egér TRESK csatorna kalcineurin-mediált aktivációjában a Ser 276-os oldalláncon kívül a vele majdnem szomszédos Ser 274-es, Ser 279-es (Ser^{276} cluster) és a kissé távolabbi Ser 264-es oldalláncoknak van még szerepe. A humán TRESK aktivációjakor a kalcineurin által defoszforilált szerinek a Ser 252, valamint a közeli szomszéd Ser 262, Ser 264 és Ser 267 (Ser^{264} cluster) [68].

A kalciumszenzor kalmodulin által aktivált kalcineurin fontos szerepet tölt be az adaptív immunválaszban. A szerin/treonin foszfatáz a citoplazmában jelen lévő *nuclear factor of activated T-cells* (cNFAT) transzkripciós faktort defoszforilálja, így az aktivált NFAT a sejtmagba transzlokálódik, ahol az interleukin-2 (IL-2) expresszióját fokozza. Az IL-2 fokozza a T-helper (T_H) sejtek aktivitását, és más citokinek termelését is elősegíti. Ez a folyamat a T_H sejtekben (T_H limfocitákban) azt követően játszódik le, hogy az antigénprezentáló és a T sejt receptora közti kölcsönhatás kalciumjelet hoz létre a T sejtben. A kalcineurin egyik legismertebb szubsztrátja az NFAT kettő, viszonylag konzervált kalcineurin-kötő motívummal rendelkezik, ezek a PxIxIT és az LxVP, ahol az x helyén bármely aminosav állhat. A humán és az egér TRESK csatorna intracelluláris hurokrégióján is megtalálhatóak ilyen NFAT-szerű kalcineurin-kötő motívumok, az egér PQIVID és a humán PQIIIS, valamint az egér LQPP és a humán LQLP [86-87].

Munkacsoportunk kimutatta, hogy a TRESK csatorna kalcineurin hatására létrejövő aktivációjakor az intracelluláris hurokban elhelyezkedő kalcineurin-kötő NFAT-szerű motívumoknak döntő szerepe van. A TRESK defoszforilációja közben a kalcineurin kötődik a csatornához a PQIVID (egér TRESK) , ill. a PQIIIS (humán TRESK) szakaszon, és a csatorna megfelelő aktivációjához elengedhetetlen ez a protein foszfatázzal kialakuló nem-katalitikus kölcsönhatás [86-87]. A kalcineurin szubsztrátjaiként számon tartott foszfoszerinek ugyanis az intracelluláris hurok (TRESK-hurok) C-terminális felé eső részén helyezkednek el. A humán csatornában mindkét NFAT-szerű kalcineurin-kötő szekvencia (PQIIIS, LQLP) részt vesz a kalcineurin nem-katalitikus megkötésében, és e két kötőhely épsége szükséges a kalcineurinnal kiváltható maximális hatás kialakulásához. Az LQLP hely jelentősége

elsősorban kis amplitúdójú Ca^{2+}-jel esetén válik nyilvánvalóvá. Jelenlegi ismereteink szerint a TRESK az egyetlen ioncsatorna, amelyhez a kalcineurin közvetlenül képes kötődni, miközben aktiválja azt. Létezik ugyan még néhány más ioncsatorna, amelyek működését szintén képes befolyásolni a kalcineurin, de ez többnyire közvetve, adapterfehérjék révén jön létre [88-89].

A jelenleg rendelkezésre álló eredmények alapján úgy tűnik, hogy a TRESK kalcineurin általi szabályozásában szubsztrátként azonosított Ser oldalláncok a TRESK nyugalmi állapotában „konstitutív" foszforilált formában (foszfoszerinként) vannak jelen. Ezért adódott az a feltételezés, hogy az aktivációt okozó defoszforilációt követően egy (vagy több), a fenti szerineket (re)foszforilálni képes kináz enzim tevékenysége folytán az aktivált áram „visszaáll" a nyugalmi, kiindulási szintre. Munkacsoportunk később részben igazolta is ezt a hipotézist: a TRESK Ser 252-es (humán TRESK), ill. Ser 264-es (egér TRESK) oldalláncát a protein kináz A (PKA) refoszforilálja [85], míg a másik három, egymáshoz közeli szerineket (szerin cluster) refoszforiláló kináz továbbra is ismeretlen maradt.

A TRESK két további interakciós partnerét szintén munkacsoportunknak sikerült azonosítani. A 14-3-3 fehérjék széles körben elterjedt, homo- vagy heterodimerként működő állványfehérjék, melyek motívum-specifikus foszfoszerin és -treonin oldalláncokat ismernek fel számos sejten belüli fehérjén, köztük enzimeken, de receptorok, ioncsatornák intracelluláris részein is. A TASK C-terminális régiója valamennyi 14-3-3 izoformával kölcsönhatásba léphet, és a 14-3-3 kapcsolódása elengedhetetlen a csatorna sejtmembránba irányított, megfelelő transzportjához. A 14-3-3 adapterfehérjék családjába tartozó 14-3-3η, 14-3-3γ, valamint a 14-3-3ε és 14-3-3ζ is képes kötődni in vitro a TRESK-hurokhoz, amennyiben a megfelelő szerin foszforilált állapotban van. A TRESK 14-3-3-kötő motívuma, az RSN***S***CP konzervált a rágcsáló és humán csatornákban, és a második (vastagított dőlt betűs) szerin protein kináz A (PKA) általi in vitro foszforilációját követően az adapterfehérje asszociál a csatornához, ami hozzájárul az alapáram csökkenéséhez [90]. A 14-3-3-at kihorgonyzó foszfoszerin (S252 a humán, S264 az egér csatornában) egyben a kalcineurin egyik szubsztrátja is, habár a kalcineurin okozta aktivációban másodlagos a Ser^{264} (humán), ill. a Ser^{276} (egér) clusterekhez képest.

A TRESK és a 14-3-3 koexpressziója során *Xenopus* heterológ rendszerben csökken a kalciumjel hatására aktivált K^+-áram visszaállásának sebessége. Ez nemcsak a vad, hanem a Ser264Glu (egér) mutáns TRESK csatornán is megfigyelhető. Ez a mutáns a 264-es pozícióban nyilván nem foszforilálódhat, így a 14-3-3 kötésére sem képes, tehát az aktivált csatorna áramának visszaállásában a 14-3-3 nem a Ser 264-et célzó útvonalon keresztül vesz részt. Így sejthető, hogy az állványfehérje valamilyen módon a Ser^{276} clustert refoszforiláló kináz hatását gátolja [85]. Ez azt mutatja, hogy mind a direkt, mind az indirekt 14-3-3–TRESK interakciónak további, ismeretlen részletei várnak még felfedezésre.

Munkacsoportunk a közelmúltban írta le, hogy in vitro a tubulin szintén kötődik a TRESK intracelluláris hurokrégiójához. A tubulinkötésért felelős területet egy 16 aminosav hosszú szakaszra sikerült szűkíteni, mely magában foglalja a Ser clustert, és közel van a 14-3-3 kötő motívumhoz is. Ez utóbbi részben magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért verseng a tubulin és a 14-3-3 a TRESK-hurokhoz történő kapcsolódásuk során [91]. Említésre méltó, hogy a DRG-ben expresszálódó $P2X_2$ receptor tubulinkötő motívumának középső részén található hat aminosavnyi szekvenciához (LVLGQI) mennyire hasonlít a TRESK-hurok tubulinkötésért felelős részének az első hat aminosava (LVLGRL) [92].

A TRESK-áram GPCR ingerlést követő markáns aktivációjának vizsgálatakor felmerült, hogy a receptor jelátviteli kaszkádja során aktiválódó protein kináz C (PKC) nem befolyásolja-e a csatorna működését. A nem specifikus PKC aktivátor forbol-mirisztil-acetát (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) az egér TRESK-áramra nincs hatással, azonban a humán TRESK-áram PMA hatására viszonylag lassan háromszorosára aktiválódik, és ez ciklosporinnal nem védhető ki, tehát kalcineurin-független [93]. Farmakológiai megközelítések alapján feltételezhető, hogy nem-konvencionális (novel) PKC izoforma felelős a humán csatorna PMA általi aktivációjáért. Ha a humán TRESK-ben valamennyi intracelluláris konszenzus PKC foszforilációs helyet egyenként elrontották irányított pontmutációval, akkor semmilyen változás nem történt a PMA közvetítette áramnövekedésben. Felmerül, hogy indirekt hatásról van szó, de az sem kizárt, hogy a PKC több helyen is képes foszforilálni a TRESK-et, melyek hatása egymással helyettesíthető. Az egér ortológon hiányzik a

humán TRESK-ben megtalálható nyolc különböző PKC foszforilációs hely, ami indokolhatja az eltérő PMA-érzékenységet.

3.2.3 Farmakológiai sajátosságok

A TRESK általános farmakológiai tulajdonságai többnyire megfelelnek a többi K_{2P} csatornáénak. Nem, vagy csak kevéssé érzékeny klasszikus K^+ csatorna gátlószerekre, mint 4-aminopiridinre (az egyes gátlószerek után zárójelben megadott koncentrációk nem voltak hatással a TRESK áramra) (4-AP, 1 mM), apaminra (100 nM), CsCl-ra (1 mM), vagy az ATP-szenzitív K^+ csatorna blokkoló tolazamidra, glipizidre. A tetraetil-ammónium (2 mM) azonban enyhén (24-34%) gátolja a humán TRESK áramot, míg az egér ortológot lényegében nem befolyásolja [94].

Az extracelluláris Ba^{2+}, a befelé rektifikáló K^+ csatornák gátlószere csak magas (3 mM) koncentrációban gátolja a TRESK-et. A gátlás feszültségfüggő, pozitív membránpotenciálokon csökken a Ba^{2+} hatása. A nem szelektív K^+ csatorna gátló quinin (100 μM, közel 80%-os gátlás) és a quinidin (IC_{50}~10 μM) hatékony TRESK gátlószer, és az arachidonsav is gátolja a TRESK áramot (IC_{50} ~10-20 μM) [67;69]. Ez utóbbi farmakológiai ágensek azonban egyáltalán nem szelektívek a TRESK-re, hatásuk nem specifikus, számos más ioncsatornán is érvényesül.

Az extracelluláris pH a TASK-hoz hasonló mechanizmussal, de jelentősen kisebb mértékben befolyásolja az egér TRESK áramot: az EC savanyodás (pH 6) enyhén gátolja, míg az alkalizáció (pH 9) aktiválja. Az egér és a többi rágcsáló TRESK csatornáiban az első pórusdoménhez közel, az extracelluláris hurkon elhelyezkedő hisztidin felelős a pH-szenzitivitásért [69;76], a TASK-hoz hasonlóan. A humán ortológ azonban nem reagál az EC pH változásaira, mivel a rágcsálókéval homológ pozícióban tirozin aminosavat tartalmaz His helyett. Szubsztitúciós pontmutánsokkal azonban a hisztidint aszparaginra vagy a tirozint hisztidinre cserélve a pH-érzékenység megszüntethető, ill. kialakítható a megfelelő fajok TRESK csatornáiban.

A helyi érzéstelenítők (elsősorban az amid típusúak) szintén számos K_{2P} csatorna működését befolyásolják [67;69]. A humán TRESK-et a vizsgált helyi érzéstelenítők közül legjobban a bupivakain, legkevésbé pedig a lidokain gátolja [95]. Az egér és patkány csatorna esetén e két vegyület azonos mértékű, de jóval potensebb

gátlást fejt ki, mint a humán ortológra [76]. Ezenkívül érdekes megfigyelés, hogy a benzokain (1 mM, észter típusú helyi érzéstelenítő) az egér TRESK áramot alapállapotban alig csökkenti (≈ 15% gátlás), míg a kalcineurinnal aktivált csatornát jelentős mértékben (50%-ban) képes gátolni [68]. Tehát a csatorna aktivációs állapota is befolyásolhatja egyes farmakonok hatását, és a benzokain heterológ rendszerben felhasználható a makroszkópos TRESK áram aktiváltsági állapotának megítélésére.

Az inhalációs anesztetikumok a TASK és TREK alcsalád tagjait aktiválják [70;96], míg a THIK alcsalád nevét is arról kapta, hogy a halotán (és egyéb inhalációs anesztetikum is) gátolja [64]. A TRESK aktiválódik halotán, izoflurán, szevoflurán és dezflurán hatására, és a fél-maximális hatékony (effektív) koncentráció (EC_{50}) értékek minden esetben a klinikumban is alkalmazott koncentrációtartományba esnek [76;95]. A leghatékonyabbnak az izoflurán bizonyult a TRESK aktiválásában, 150 μM körüli EC_{50} értékkel. Az inhalációs anesztetikumokra a TRESK a legérzékenyebb, és aktivációja is a legnagyobb a vizsgált K_{2P} csatornák között. A TRESK kifejezett jelenléte a szenzoros és gerincvelői neuronokban, melyek az analgéziában és az immobilitásban fontos szereppel rendelkeznek, szintén az általános anesztéziában betöltött funkcióját sejteti [97]. Az anesztetikumra aktiválódó csatorna ugyanis az említett neuronok hiperpolarizációjához vezet. Ennek ellenére in vivo, TRESK génkiütött (knockout) egérmodellben nem vagy alig emelkedett a minimális alveoláris koncentráció (MAC), csak az izoflurán esetén volt enyhe, 8%-os emelkedés [98]. Tehát a TRESK hiánya szinte egyáltalán nem okoz változást az anesztéziához szükséges hatóanyag koncentrációját tekintve, így feltételezhető, hogy a TRESK nem is játszik jelentős szerepet az inhalációs anesztetikumok hatásmechanizmusában, vagy más anesztetikum-érzékeny csatornák, receptorok képesek gyakorlatilag teljes mértékben helyettesíteni a hiányát.

A TRESK-áramot befolyásoló farmakonok többé-kevésbé más K_{2P} csatornára is hatnak, ezért jogos az igény új, (részben, legalább a K_{2P} családon belül) specifikus, lehetőleg csak a TRESK-re ható ágensek iránt. Számos sejtben ugyanis egyidejűleg eltérő típusú K_{2P} csatornák is jelen vannak, koexpresszálódnak, ezért az egyes K_{2P} csatorna típusok áramának elkülönítésére specifikus gátlószerekre lenne szükség. Kutatócsoportunk 240 hatóanyagot tesztelt a *Xenopus* heterológ expressziós rendszerben az egér TRESK csatornán, és sikerrel azonosította a K_{2P} csatornákon belül

specifikusan a TRESK-re ható kétértékű higany- és cinkionokat [99]. Extracellulárisan alkalmazva mindkét kation potens és effektív gátlószere a TRESK-áramnak (IC_{50} értékük 10 μM alatti és több mint 50%-os áramcsökkenést okoznak). A cink hatása azonban fajspecifikus, a humán TRESK érzéketlen az ionra. Az extracelluláris pH-érzékenységhez hasonlóan a cink hatásáért is ugyanaz a pórusközeli His (His132 az egér TRESK-ben) felelős, így érthető, miért nem hat a cink a humán ortológra, ahol a kérdéses His hiányzik.

Habár a cink kis (20% alatti) mértékben csökkenti a TRAAK és TASK-3 áramát is, azonban ezek a csatornák ruténiumvörössel jóval hatékonyabban gátolhatók szemben a polikationos festékre teljesen érzéketlen TRESK-kel. A higany hatékonyan, de lassan és irreverzibilisen gátolja a humán és az egér TRESK csatornát is, míg az összes többi vizsgált K_{2P} csatornára vagy nem hat, vagy érdekes módon a TASK-3, TREK-1 és TREK-2 áramát aktiválja. Így elvileg a Hg^{2+} alkalmas lehet a TRESK-áram kimutatására olyan natív sejtekben, ahol egyéb K_{2P} csatornák is expresszálódnak. A gyakorlatban azonban nem terjedt el sem a Hg^{2+}, sem a Zn^{2+} használata, valószínűleg részben toxikus voltuk, valamint a K_{2P} csatornák között sem teljesen szelektív hatásuk miatt. Ezért tovább folytatódnak a hatékony TRESK aktiváló- és gátlószer utáni kutatások.

Az elsődlegesen antidepresszánsként ismert sipatrigin és fluoxetin nemcsak a TRESK, hanem a TREK alcsalád tagjait is gátolja [3;100-101]. Azonban a sipatrigin származék lamotrigin csak a TRESK-áramot gátolja (IC_{50} értéke 10 μM-os tartományban van), a TREK csatornákra nem hat [84]. Noha a lamotrigint számos tanulmányban használták a TRESK in vivo kimutatására, szelektivitását tágabb vonatkozásban nem vizsgálták. Egy változatos komponensekből álló könyvtár tesztelése során ezer hatóanyag közül tizenkettőt azonosítottak a TRESK-áram aktivátoraként, ezek közül az amőba-ellenes szerként használt cloxyquin bizonyult a legpotensebbnek (EC_{50} =3,2 μM) [101]. Azonban alaposan ennek sem vizsgálták meg a specificitását, még a K_{2P} családon belül sem, csak néhány más családba tartozó K^+ csatornán ellenőrizték. A cloxyquin hatásmechanizmusa is tisztázásra vár.

3.2.4 A TRESK pontos élettani funkciója még nem ismert

RT-PCR és immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a TRESK fiziológiásan legnagyobb mennyiségben a primer szenzoros hátsó gyöki és trigeminális ganglionok neuronjaiban expresszálódik [81;97;102]. A DRG-ben a TRESK mellett számos további K_{2P} csatorna mRNS-ét is azonosították, így a TREK-2, TREK-1, TRAAK, TWIK-1, és kisebb mennyiségben a TASK csatornákét is. Azonban az eddig megismert, DRG idegsejtben funkcionálisan is kifejeződő K_{2P} csatornák köre ennél szűkebb. Újszülött patkányokból származó, enzimatikusan disszociált néhány napos DRG tenyészet neuronjain történt single channel (cell-attached és inside-out) mérések szerint a DRG háttér K^+ áramának két fő komponense a TRESK és a TREK-2, ezenkívül TREK-1 és TRAAK aktivitást is kimutattak. Azonban a TRESK és TREK-2 aktivitása különböző hőmérsékleteken eltér, 24 ºC-on mérve ugyanis a TRESK adja a háttér K^+ áram nagy részét, míg 37 ºC-on a hőmérséklet-érzékeny TREK-2, de mindkét esetben a szóban forgó két K_{2P} csatornán folyó áram összege biztosítja ezen idegsejtek háttér K^+ áramának döntő többségét [78].

A TRESK elsősorban a DRG kis és közepes méretű idegsejtjeiben található, melyek nociceptív funkcióval rendelkeznek. Természetesen ezek az ex vivo mérések a DRG neuronok sejttestjein történtek (az izolálás során a neuritok jelentős része elszakad, elvész). A pszeudounipoláris neuronok nyúlványa (axon) kettéágazik, a centrális ág a gerincvelő hátsó szarvába tér, és ott létesít szinapszist, míg a perifériás ág mint afferens szenzoros ág a bőrhöz, izmokhoz és egyéb szervekhez fut. Így felmerül az az izgalmas kérdés, hogy a maghőmérsékletnél alacsonyabb hőfokon is jól működő TRESK csatorna szubcelluláris lokalizációjában a szómán kívül szerepel-e egyéb képlet, elsősorban a perifériás ág.

Hasonló, bár kvantitatíve eltérő eredmények születtek a TRESK áram DRG neuronokban betöltött szerepére vonatkozóan felnőtt egerekből származó, idősebb DRG-tenyészeteken teljes-sejt konfigurációban mérve. Számos tényező befolyásolhatja ugyanis a csatorna expresszióját. Megfigyelték, hogy a kis és közepes méretű DRG neuronok izolálása (ami elkerülhetetlen axotómiával jár) a sejtek fokozott ingerlékenységét okozta, miközben a TRESK expressziója is kimutathatóan csökkent már négy órával a sejtizolálást követően. In vivo, neuropátiás fájdalmat modellező

állatkísérletekben a TRESK expressziója szintén jelentősen csökkent (három héttel az idegsérülést létrehozó beavatkozás után), míg számos egyéb K_{2P} csatorna expressziójában nem találtak változást [3].

A trigeminális ganglion idegsejtjeit TRESK csatornával tranziensen transzfektálva azt tapasztalták, hogy csökkent a neuronok ingerlékenysége, hiperpolarizálódtak, és egy bizonyos nagyságú ingerrel kiváltható akciópotenciál-sorozat frekvenciája jelentősen csökkent [103]. Ellentétes irányú megközelítést alkalmazva, vagyis a működőképes TRESK mennyiségének csökkentését vagy teljes hiányát előidéző géncsendesített és knockout egérmodellekben is megerősítették a TRESK áram DRG neuronokban betöltött szerepét. TRESK-specifikus siRNS-t három napig többször adva intrathecalisan 42%-ra esett vissza a csatorna mRNS-ének expressziója, míg a fájdalmas mechanikai ingerrel kiváltott láb-visszahúzás küszöbértéke csökkent [3]. Mindkét vizsgált paraméter ugyanúgy változott, mint in vivo axotómia esetén.

A funkcionális TRESK knockout (TRESK G339R) egérből származó DRG neuronok ingerlékenysége fokozódott, fenntartott, kifelé irányuló áramuk pedig 27%-kal csökkent [81]. Azonban a nyugalmi membránpotenciál nem változott meg, hasonlóan más, a TRESK csökkent expresszióját vagy aktivitását eredményező vizsgálatokhoz. Meglepő módon az akciós potenciálok időtartama csökkent, és az utóhiperpolarizáció felerősödött, amit a knockout állatban a TRESK hiánya miatt kompenzatorikusan overexpresszálódó feszültségfüggő vagy egyéb, nem K_{2P} típusú K^+ csatorna okozhatott. Egy másik TRESK knockout törzsben a termális nocicepció mérsékelten emelkedett, csökkent a látencia az ún. *hot plate* (forró lap) tesztben [98].

A nociceptív DRG és TRG neuronokban a TRESK gyakran az „excitátoros" TRPV1 és TRPA1 ioncsatornákkal együtt fordul elő, melyek mind befolyásolhatók a szecsuáni bors bioaktív komponensével, a *hidroxi-α-sanshool* (HαSS)-lal, és ennek szintetikus származékával, az IBA-val (isobutylalkenyl amide). Izolált (patkány) DRG neuronokhoz IBA-t adva azok depolarizálódtak, és kalciumjel alakult ki bennük. Az aktivált neuronoknak a többsége ugyan kapszaicinra reagált, tehát TRPV1 pozitív volt, de egy kis hányaduk nem, tehát esetükben biztos nem a TRPV1 csatorna felelős az IBA hatásáért. Az IBA-t patkány hátsó végtagjainak a mancsába injektálva fokozódott a C-

nociceptorok spontán aktivitása, ami a mechanikai ingerek iránti fokozott érzékenységben nyilvánult meg [3].

A HαSS a TRESK-áramot gátolja, míg feltehetően a TRPV1 és TRPA1 csatornákat aktiválja. Emellett a trigeminális ganglionban kisebb mennyiségben jelenlévő TASK-1 és TASK-3 csatornákat szintén gátolja, valamint aktiválja a feszültségfüggő $Na_v1.7$ nátrium csatornát [79;104-105]. A szecsuáni borsot fűszerként elfogyasztva a szájban jelentkező jellegzetes, bizsergő érzés hátterében feltehetőleg részben a TRESK csatorna gátlása áll, míg az állatkísérletekben tapasztalható averzív magatartásért felelős mechanizmusok kevésbé egyértelműek [79;106].

Tehát a TRESK mint a DRG és TRG kis és közepes méretű nociceptív neuronjainak egyik domináns háttér K^+ árama új típusú fájdalomcsillapítók támadáspontja lehet, hiszen a TRESK overexpressziója ellensúlyozza vagy legalább enyhíti a neuropátiás kísérleti modellekben a hiperszenzitivitást [2;103].

A TRESK mRNS-t, valamint a funkcionáló csatornát (single channel, cell-attached méréssel igazoltan) nemcsak szenzoros, hanem afferens és efferens autonóm ganglionokban (ggl. cervicale superior és ggl. nodosum) is kimutatták, de szerepük ez utóbbi helyeken még nem tisztázott [80].

A TRESK jelentős expressziója a trigeminális ganglionban felveti a csatorna és a migrénes megbetegedések közötti összefüggés lehetőségét. A migrénnel járó kórképek egy részét megelőző jellegzetes tünetek (aura) hátterében egy lassan terjedő kortikális depolarizációs hullám (CSD, cortical spreading depression), és az ennek hatására aktiválódó trigeminovaszkuláris rendszer által a fájdalomérzékeny agyburkokban és erekben felszabadított gyulladáskeltő anyagok (proinflammatorikus peptidek, mint kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) vagy a P-anyag) állhatnak [107-108]. Ezért a TRESK is bekerült azon százötven ioncsatorna közé, melyek kóroktani szerepét egy átfogó, több mint hatszáz független migrénes beteggel foglalkozó tanulmányban vizsgálták [102]. A 2010-ben publikált cikkben a TRESK élettani szerepére vonatkozóan is érdekes eredmény született: egy négygenerációs család aurával járó migrénben szenvedő nyolc tagjában TRESK kereteltolódást (frame-shift-et) okozó, a csatorna csonkolását („trunkáció”-ját) eredményező (F139WfsX24) pontmutációt azonosítottak. A család másik nyolc tagjában, akik nem szenvedtek migrénben, nem volt jelen a pontmutáció. Az F139WfsX24 mutáns TRESK-ben a csatorna első TM

szegmense és a hosszú, extracelluláris hurok, mely a dimerizációért felel, teljesen intakt, azonban a többi rész hiányzik. Mivel a dimerizációért felelős szakasz ép, így mutáns-vad TRESK heterodimerek is létrejöhetnek, melyek működésképtelenek. Ennek megfelelően az F139WfsX24 mutáns domináns negatív hatással rendelkezik az ép TRESK csatorna felett mind *Xenopus* expressziós rendszerben (vad és mutáns TRESK koexpresszió), mind natív sejtben (izolált trigeminális ganglion idegsejteket mutáns TRESK-kel transzfektálva).

A TRESK a DRG-n és a TRG-n kívül a központi idegrendszerben is kifejeződik, beleértve az agykérget, ahol a csatorna funkcionális hiánya szerepet játszhat a migrént megelőző aura patogenezisében (lásd korábban CSD-t). Számos további tanulmányban vizsgálták egészséges kontroll és nagyszámú migrénes populációban a TRESK génjének (KCNK18) variánsait, de nem találtak kóroktani összefüggést [109-111]. Tehát a TRESK funkcióvesztéssel járó mutációja valószínűleg a migrénes megbetegedéseknek csak csekély hányadáért felelős. Ennek ellenére fentebb ismertetett expressziós mintázata és funkciója alapján a TRESK az eltérő kóroktanú aura és migrén kezelésében is ígéretes célpont lehet, hiszen a csatorna aktiválása a trigeminális ganglion és a kéreg neuronjaiban az aura és migrén patogenezisét feltehetőleg gátolja.

3.3 A TREK/TRAAK alcsaládba tartozó K_{2P} csatornák

3.3.1 Jelentős szerkezeti variabilitás, és változatos szöveti előfordulás

A TREK (**T**WIK-**RE**lated K^+ channel) alcsalád elsőként felfedezett tagja a TREK-1; (K_{2P}2.1; KCNK2, a másodikként leírt K_{2P}) [42], valamint ide tartozik a TREK-2 (K_{2P}10.1; KCNK10) [43-44] és a TRAAK (**T**WIK-**R**elated **A**rachidonic **A**cid stimulated K^+ channel; K_{2P}4.1; KCNK4) [45;112]. A TREK-1 és TREK-2 aminosav-szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat, legkifejezettebben a TMS-ek és a C-terminális szakaszán. Az alcsalád valamennyi tagjánál előfordulnak funkcionálisan aktív „hasítási" (splice) variánsok, ráadásul a TREK-1, TREK-2 esetén ugyanazon mRNS-ről is többféle működőképes csatorna transzlálódhat az alternatív transzlációs iniciáció (eltérő transzlációs kezdőpont) következtében. A splice variánsok szerkezeti különbségei csak az N-terminálisok legvégét érintik, és nem befolyásolják az alapvető biofizikai, működésbeli jellemzőket. Expressziójuk mégis jelentős szövetspecifitást mutat [30;113-114]. Az eltérő transzlációs kezdőpont azonban az N-terminális végek hosszabb szakaszán okoz különbséget, és jelentősen befolyásolja a csatorna vezetőképességét (konduktanciáját) is (TREK-1: 40 és 100 pS; TREK-2: 50 és 220 pS) [115-116]. Mind a TREK-1, mind a TREK-2 esetén az eltérő iniciáció következtében kialakult variánsok szabályozási mechanizmusai megegyeznek, ezzel is alátámasztva, hogy a TREK alcsaládba tartozó csatornák regulációjában nem az N-terminális doménnak van szerepe, hanem a TASK alcsaládhoz hasonlóan a C terminális proximális (kezdeti, közvetlenül a 4. TMS utáni) szakaszának (lásd a következő fejezetet). A TREK-1 elektrofiziológiai sajátosságaiban eltér a TREK-2 és TRAAK csatornáktól. Extracelluláris kétértékű kationok hiányában a TREK-1 áram–feszültség (I-V) görbéje szimmetrikus [K^+] oldatban közel lineáris [44], mint a TREK-2 és a TRAAK esetén is, azonban élettani koncentrációjú, extracelluláris Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok jelenlétében a TREK-1 kifejezett kifelé irányuló rektifikációt mutat (negatívabb memránpotenciál értékeken jelentősen lecsökken a vezetőképessége) [29-30;42-43]. Ezenkívül a TREK-1 feszültségfüggő kapuzása kifejezetten rendhagyó jelenség a K_{2P} csatornák körében. Membrándepolarizációra igen gyorsan aktiválódik, és deaktiválódik, azonban nem

inaktiválódik (szemben a feszültségfüggő K^+ csatornák többségével). A TREK-1 feszültségfüggése a C-terminális szakasz által közvetített tulajdonság [117-118]. A TREK-2 P_o értéke pozitív membránpotenciál értékeken a negatív potenciálokon mértekhez képest ugyanúgy jóval magasabb - hasonlóan a TREK-1-hez, azonban depolarizációra a TREK-2 single-channel konduktanciája csökken. Így e két ellentétes hatás többé-kevésbé kiegyenlíti egymást, és a TREK-2 gyakorlatilag nem, vagy nagyon enyhe kifelé irányuló rektifikációt mutat [43-44]. A TRAAK konduktanciája fiziológiás extra- és intracelluláris [K^+] esetén 45 pS pozitív membránpotenciálon ($0-^+60$ mV). Teljes-sejt („whole-cell") elrendezésben vizsgálva a TRAAK-áram klasszikus háttér áram, azonban izolált memrándarabon depolarizációra jelentősen fokozódik az aktivitása [28;45].

A TREK/TRAAK csatornák expresszióját rágcsálókban és emberben is megvizsgálták az egyedfejlődés különböző stádiumaiban [119]. A TREK-1 és TREK-2 különösen nagy mennyiségben expresszálódik az embrionális és éretlen egéragyban. Felnőtt korban a TREK-1 elsősorban a kéregben, a striatumban, a hipotalamuszban, a hippokampuszban és az amygdalaban [120;121], míg a TREK-2 a hippokampuszban, a striatumban, a bulbus olfactoriusban és a kisagyi szemcsesejtekben található [44;113;120;122]. A kérgi asztrocitákban a TREK-1 és TREK-2 is hozzájárul a nagy amplitúdójú háttér K^+ áramhoz [123-124]. Az egér TRAAK az embrionális agyvelőben kevésbé fejeződik ki, születés után azonban már az első hét végére maximális az expressziója [121]. Nagy mennyiségben található a retinában, a kéregben és a gerincvelőben [45]. A TREK/TRAAK csatornák nagymértékben expresszálódnak a perifériás idegrendszer szomatoszenzoros sejtjeiben, a kis és nagy átmérőjű hátsó gyöki, valamint a trigeminális ganglionok neuronjaiban [125-127], ahol a különböző szenzoros modalitások érzékelésének afferens útját modulálják, a korábban már említett TRESK-kel és egyéb K_{2P}, ill. más típusú ioncsatornákkal együtt [32;78;128]. A szimpatikus felső nyaki ganglionban (ggl. cervicale superius) is kimutatták funkcionális jelenlétüket [129], a TREK-1 és TRAAK csatornákat pedig a ganglion nodosum vagalis afferenseiben is felfedezték [130].

A TREK-1 az idegrendszeren kívül számos helyen megtalálható: az üreges szervek és egyes artériák simaizomzatában, a szívizomban, a hámsejtekben, bizonyos erek endothel sejtjeiben, a tüdőben, a vesében és a mellékvesében is [131-140]. A

TREK-2 legnagyobb mennyiségben a lépben, a herében, a hasnyálmirigyben és a vesében fejeződik ki, kisebb mértékben egyéb helyeken (méhlepény, tüdő, máj, vastag- és vékonybél, szívpitvar) is [43-44;113;139;141]. A TRAAK funkcionális jelentőségét az idegrendszeren kívül eddig humán miometrium simaizomsejtjeiben mutatták ki, ahol a TREK-1-gyel szabályozzák a méh kontraktilitását [135;142].

3.3.2 Mechano- és termoszenzitivitás, pH, lipidek és foszforiláció általi szabályozás

Figyelemreméltóan változatos és nagyszámú tényező befolyásolja a TREK/TRAAK csatornák működését. Nemcsak mechano- és termoszenzitívek, de számos (membrán)lipid(származék), az extra- és intracelluláris pH, G-fehérje-kapcsolt receptorok, kinázok és adapterfehérjék is szabályozzák e csatornák aktivitását, illetve esetenként a plazmamembránba való kihelyeződésüket.

Nyugalmi körülmények között a TREK/TRAAK csatornák kevéssé aktívak, azonban a csatornákat kifejező sejtek deformálódására, mechanikai ingerek hatására nyitvatartási valószínűségük megváltozik. A mechanoszenzitivitás a plazmamembrán és a csatorna közvetlen kölcsönhatásának eredménye, a jelenlegi elképzelés szerint a membránfeszülés közvetlenül változtatja a csatorna konformációt, és ezáltal a K^+ áram nagyságát [36]. Az extracelluláris hiperozmolaritás csökkenti a TREK-1 és a TRAAK áramamplitúdóját [28-29;118]. Ezzel szemben a patch-pipettán keresztül alkalmazott szubatmoszférás (negatív) nyomás, ami a sejttérfogat növekedéséhez hasonlítható membránalak-változást eredményez, reverzibilisen aktiválja valamennyi TREK/TRAAK csatornát [28-30;44;143]. Ez a szabályozás kivágott membrándarabon („excised patch”-en) is érvényesül, akkor is, ha teljes mértékben megszüntetik a kivágott membrándarab citoszkeletális kapcsolatait. A mechanikai ingerre bekövetkező aktiválódás reverzibilis és gradált is, azaz mértéke arányos a kiváltó inger nagyságával. A TREK-1 lamináris nyírófeszültség hatására is aktiválódik.

Élő sejtben a citoszkeletális rendszer farmakológiai roncsolása (colchicin vagy cytochalasin D kezelés révén) aktiválja valamennyi TREK/TRAAK csatornát. Ez arra utal, hogy in vivo a citoszkeletonnak jelentős moduláló hatása van, habár a mechanoszenzitivitás a csatornák citoszkeletontól különválasztható, saját tulajdonsága.

Úgy tűnik továbbá, hogy a kapcsolat kétirányú, ugyanis a TREK/TRAAK csatornák is befolyással vannak a citoszkeleton szerveződésére [30;143-144]. A TREK-1 expresszió (függetlenül a csatorna aktivitásától) elősegíti az aktin hálózat felépülését [144](lásd később is a funkciónál).

A mechanoszenzitivitást befolyásolja az intracelluláris pH, a membránpotenciál vagy az arachidonsav koncentrációja is. A mechanoszenzitív jellegért a transzmembrán szegmensek felelősek, elsősorban a 4. TMS, valamint az azt követő, megközelítőleg 30 aminosav hosszú szakasz a C-terminálisból (a proximális rész) [29;34]. Számos lipid természetű molekula is befolyásolja a TREK és TRAAK csatornák működését, a TRAAK esetében ez már az elnevezésből is kiderül. Az arachidonsav (arachidonic acid, AA) és más, többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA) is, mint például a dokozahexaénsav, linolénsav, linolsav közvetlenül aktivál. Emellett mechanikai ingerre érzékenyítik a csatornákat, azaz kisebb mérvű nyomásváltozás is képes ugyanakkora aktivációt kiváltani jelenlétükben [43-44;145]. A PUFA-k a membrán mindkét oldala felől alkalmazva hatnak, bár intracellulárisan adva sokkal gyorsabban [30;45;143], mérsékelik a cAMP/PKA által kifejtett gátlást (ld. alább) [29]. A mechanoszenzitivitáshoz hasonlóan a PUFA-k kivágott membrándarabban is aktiválják a csatornát, és hatásukat a C-terminális kezdeti szakasza közvetíti, a TRAAK kivételével [29-30;143]. A PUFA-k in vivo megfigyelhető neuroprotektív hatását jelentős részben a TREK-1 aktiváció közvetíti [77;146].

Töltéstől függetlenül különböző lizofoszfolipidek is aktiválják a TREK/TRAAK csatornákat, gyorsabb kinetikával, mint az AA. A lizofoszfatidsav aktiválja mindhárom TREK/TRAAK csatornát, és a PUFA-khoz hasonlóan a mechanoszenzitivitás iránt is érzékenyít [147-148]. A plazmamembrán belső lipidrétegében elhelyezkedő savas karakterű foszfolipidek, a foszfatidil-inozitol-(4,5)-biszfoszfát (PIP_2) és kisebb mértékben a foszfatidilszerin aktiválja a TREK-1 áramot, feltehetőleg a C-terminális kezdeti szakaszán található pozitív töltésű aminosav-oldalláncokon (polibázikus motívumon) keresztül [149-151]. A G_q-fehérje-kapcsolt receptorok ingerlése a foszfolipáz C enzim serkentése révén jelentősen csökkenti a plazmamembrán PIP_2-szintjét, így hozzájárul a csatornaműködés dinamikus szabályozásához.

A TREK/TRAAK csatornák fokozatosan, reverzibilisen és jelentős mértékben (akár húszszorosára is) aktiválódnak a hőmérséklet emelkedésére a 14-42 ºC-os

tartományban, ezen belül 30-42 ºC között érik el a maximumot, efelett aktivitásukat fokozatosan elvesztik. Így fiziológiás körülmények között normál testhőmérsékleten jelentős aktivitást mutatnak [31-32;126]. A hőmérséklet-érzékenység azonban „excised patch”-en megszűnik [31-32;126]. A többi szabályozó faktorhoz hasonlóan a hőmérséklet sem az egyedi csatorna konduktanciát befolyásolja, hanem a P_o-t, vagyis a csatorna kapuzását, valamint a hőmérséklet-érzékenységért is a C-terminális szakasz felelős a TREK-1 esetén, de furcsa módon a TREK-2 C-terminálisának lecserélése a TASK-3 megfelelő szakaszára nem befolyásolja a csatorna termális regulációját [32].

Az intracelluláris pH is befolyásolja a TREK alcsaládba tartozó csatornák működését, míg az extracelluláris pH kevésbé, szemben a többi (pl. TASK vagy TALK) pH-érzékeny K_{2P} csatornával. A sejten belüli savanyodás nemcsak robusztus áramnövekedést eredményez a TREK-1 és TREK-2 esetén, hanem megszünteti a feszültségfüggést, valamint az AA, a nyomásingerek és a foszforiláció (ld. később) iránti szenzitivitást [28;30]. A TRAAK az intracelluláris pH növekedésére fokozza működését [143]. A pH-érzékenység kivágott membrándarabon is megtartott. A TREK-1 protonszenzora (Glu 306) a proximális C-terminálison a membrán foszfolipidekkel kölcsönható öt bázikus aminosav szomszédságában található. A TREK-2 és TRAAK C-terminálisán is megtalálható a homológ pozíciójú glutamát, de a TRAAK esetén nincs befolyással se a csatorna aktivitására, se az intracelluláris alkalizáció iránti érzékenységre. A TRAAK C-terminálisa nem szükséges a pH-függő szabályozáshoz [34].

Az extracelluláris pH kevésbé befolyásol, mint az intracelluláris. Az EC savanyodás gátolja a TREK-1 áramát, míg a TREK-2 áramnövekedéssel reagál [152-154].

A TREK/TRAAK csatornák C-terminálisát több helyen is képes foszforilálni a protein kináz A és C (PKA, PKC), mely enzimek a G_s- és a G_q-fehérje-kapcsolt receptorok (például egyes szerotonin, glutamát, muszkarinerg M3 receptorok) ligandkötését követően aktiválódnak nagy mennyiségben. A foszforiláció a TREK-1 és TREK-2 alapáramát gátolja, míg a TRAAK működésére nincs hatással [42;45]. A két kináz hatása additív, mely eltérő foszforilációs helyekre utal egy csatornán belül. A TREK-1 C-terminálisa két konszenzus PKA-foszforilációs helyet tartalmaz (Ser 333 és Ser 351), melyek közül az első („proximálisabb”) bizonyult a fontosabbnak, és ez

konzervált a TREK-2-ben is [42;44;75]. A második szerin a PKA-nak csak gyenge szubsztrátja, azonban az NO/cGMP/protein kináz G útvonalnak fő célpontja, és funkcionálisan kiemelt jelentősége van az így létrejövő TREK-1 áramnövekedésnek. Ez az útvonal a majdnem azonosan szabályozódó TREK-2-nél hiányzik.

A foszforiláció a legtöbb szabályozó tényezőhöz hasonlóan a TREK-1 nyitvatartási valószínűségére hat, de „excised patch”-en elsősorban a negatív membránpotenciálokon csökkenti a P_o értékét, tehát fokozza a látszólagos kifelé irányuló rektifikációt. Így a TREK-1 PKA általi foszforilációja részlegesen feszültségfüggővé teszi a csatornát [117].

A TREK-1 PKA általi foszforilációja szükséges a PKC általi foszforilációjához, tehát mintegy szekvenciálisan foszforilál a két kináz [33]. A G_i-fehérje-kapcsolt receptorok stimulációjakor vagy protein kináz inhibitorok hatására csökken az aktív PKA mennyisége, és ez a TREK-áramok növekedését eredményezi [44;155]. A G_i-fehérje-kapcsolt receptorok (α2 noradrenerg és egyes metabotróp glutamát receptorok) stimulációja a központi idegrendszerben a TREK áramfokozódás révén a kórosan fokozott ingerlékenység csökkentésében szerepet játszhat. A TREK-2 is nagyon hasonlóan foszforilálódik és gátlódik PKA/PKC hatására. Emellett mind a TREK-1, mind a TREK-2 vonatkozásában az AMP-aktivált protein kinázok (AMPK) is ugyanazokon a szerineken hatnak, melyeken a PKA/PKC, és hatásuk is megegyezik azokéval [156].

A neuronokban szignalizációs komplexek létrehozásáért felelős állványfehérje, az A-kinase-anchoring protein 150 (AKAP150) a TREK-1 és a TREK-2 C-terminálisának kezdeti szakaszához képes kötődni [157-158]. A PKA és PKC enzimek mellett számos szinaptikus fehérjét, receptort és ioncsatornát hoz térbeli közelségbe ez az állványfehérje. A TREK-1 és az AKAP150 asszociációja maximális mértékben aktiválja a TREK-1 áramát, mely a továbbiakban nem fokozható se AA, se mechanikai stimulus, se IC savanyodás hatására. A folyamatnak a térbeli, vizuális tanulásban tulajdonítanak szerepet [159].

A TREK csatornák egy másik állványfehérjével is kapcsolódhatnak, melyek a dendritekben, főleg a dendrittüskék közelében, valamint a növekedési kúpokban helyezkednek el. A „microtubule-associated protein 2” (MAP2) a C-terminális distálisabb, tehát a membrántól távolabbi részéhez kötődik, mint az AKAP150, így a

TREK csatornákon a két állványfehérje egyidejű jelenléte is lehetséges [158]. A MAP2 miközben a TREK-1-hez kötődik a tubulinhoz is kapcsolódik, és növeli a plazmamembránban a csatorna denzitást, tehát a sejten belüli csatornaforgalmat szabályozza [158].

3.3.3 Funkcionális jelentőség a központi idegrendszerben és számos különböző szervben

A TREK-1, és kisebb mértékben a TREK-2 overexpressziója az újszülött patkány hippokampális neuronjaiban állábszerű kitüremkedéseket eredményez, melyekben a csatorna az aktinnal és az ezrinnel kolokalizál [144]. A hatáshoz nem szükséges a csatorna vezetőképes állapota. A TREK-1 knockout egérből származó tenyésztett striatum neuronjain szignifikánsan kevesebb a növekedési kúp, és a neuronok felülete is kisebb a vad típushoz képest [144]. Ez szintén a TREK-1 neuronális morfogenezisben betöltött szerepére utal, amit az a korábbi megfigyelés is támogat, hogy a TREK-1 mRNS az emberben és az egérben is már a magzati agyvelőben jelentős mértékben kifejeződik [128]. Azonban a TREK-1 knockout egér agyveleje morfológiailag fiziológiásnak tűnik [77], és más, hasonló funkcióval rendelkező csatorna kompenzatorikus overexpresszióját nem sikerült kimutatni ezekben az állatokban.

Régóta ismert a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) neuroprotektív hatása: jótékonynak bizonyultak az ischaemia kiváltotta neurodegenerációban [160], in vivo antikonvulzáns és sejttenyészeteken epileptiform aktivitást tompító hatással rendelkeznek [161-162], gátolják a feszültségfüggő Na^+- és Ca^{2+} csatornákat, valamint a glutamát transzmissziót is közvetlenül befolyásolják [163-164]. Így a TREK/TRAAK csatornák jellegzetes AA és egyéb PUFA általi aktivációja és kiterjedt idegrendszeri lokalizációja potenciális neuroprotektív szerepet feltételez ezeknek a háttér K^+ csatornáknak. Számos TREK-1 knockout egereket vizsgáló tanulmányban fény derült rá, hogy exogén eredetű PUFA jelenlétében a TREK-1 igen hatékony neuroprotektív szerepet tölt be. Fontos azonban megjegyezni, hogy ischaemiás körülmények között számos egyéb faktor (intracelluláris acidózis, sejtduzzadás, a felszabaduló AA vagy

lizofoszfolipidek) is aktiválja a csatornát, növelve ezzel a TREK-1 neuroprotektív jelentőségét.

Bizonyos cerebrális, mesentericus erek, valamint a bőr mikroerek simaizomzatában és endotélsejtjeiben a TREK-1 csatornának fontos feladata van a PUFA-k és az acetilkolin által közvetített vazodilatációban, ugyanis aktiválódásuk idézi elő a simaizomsejtek hiperpolarizációját, relaxációját [131;165-166]. Így cerebrovaszkuláris ischaemiában a PUFA-k által közvetített TREK-1 aktiváció direkt neuronra és az érfal simaizomsejtre kifejtett hiperpolarizáló hatása duplán neuroprotektív.

Knockout egérmodelleken történt vizsgálatok világítottak rá, hogy a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok neuronjaiban található TREK-1 és TRAAK csatornák fontos szereppel bírnak a termális és a mechanikai fájdalmas ingerek tompításában, elsősorban a mérsékelt intenzitású ingertartományban [125-126;128]. Fontos megemlíteni, hogy krónikus fájdalom vagy gyulladás esetén is működnek, így terápiás célpontként is szóba jöhetnek [126].

A szív ún. mechanoelektromos feedback mechanizmusában patkányban a TREK-1 mechanoszenzitív csatorna fontos szerepet tölt be [138;167]. Emellett szívizom ischaemiában a K_{ATP} csatornák mellett a TREK-1 is védő funkcióval rendelkezik, az intracelluláris acidózis mellett az extracelluláris ATP hatására felszabaduló AA is aktiválja a csatornát [168-169].

Az üreges szervek adaptív relaxációjának folyamán elsősorban a fokozott feszülés mint mechanikai inger váltja ki több helyen (gyomor-bélrendszer, húgyhólyag, méh) a simaizomzatban a TREK-1 aktiválódását, így a sejtek hiperpolarizálódnak, és nem jön létre kontrakció. A gyomor antrumában a TREK-2 tölti be ugyanezt a funkciót [136;170-171].

Az emberi mellékvesekéreg domináns háttér K^+ áramának fő komponensei között a TASK-1 és TASK-3 mellett a TREK-1 is megtalálható [172-173], de jelentős fajok közötti különbségek vannak. A szarvasmarha zona glomerulosa és fasciculata sejtekben a TREK-1 dominál [174], míg a patkányban a TASK-3 [175].

A TREK/TRAAK alcsaládon belül az igen közeli rokon TREK-1 és TREK-2 jelentős funkciót tölt be az anesztetikumok hatásmechanizmusában. Az anesztetikumok egyik fő támadáspontja valamilyen ligandfüggő ioncsatorna, elsősorban a $GABA_A$

receptorok [176], de az inhalációs anesztetikumok hatására különböző K_{2P} csatornák aktivációját is megfigyelték. A TREK-1 és TREK-2 számos inhalációs anesztetikumra robusztusan aktiválódik, és az egyes szerek iránti érzékenységük nagyfokú hasonlóságot mutat [44;70]. A TREK-1 kifejezett központi idegrendszeri lokalizációja teszi ezt a csatornát a K_{2P} család legfontosabb általános anesztéziáért felelős tagjává. Számos $GABA_A$ receptoron hatástalan érzéstelenítőszer aktiválja a TREK-1 áramot, de a TASK-1 áramára nem hat [74-75]. Ismert, hogy az inhalációs anesztetikumok pre- és posztszinaptikus támadásponttal is rendelkeznek. Immunhisztokémiai módszert alkalmazva a TREK-1 csatorna preszinaptikus elhelyezkedését és a (szinaptikus vezikulák ürülését szabályozó) synapsin foszfoproteinnel való kolokalizációját mutatták ki [146;177].

A széles körben elterjedt és népszerű szelektív szerotonin visszavétel gátló (SSRI) antidepresszánsok – nevükkel ellentétben – nem csak a szerotonin transzportra hatnak. A klinikumban is használt fluoxetin, norfluoxetin, paroxetin és sipatrigin SSRI-k gátolják a TREK-1 és a TREK-2 áramot, de a TRAAK-ra nem hatnak [100;178-180]. Az alcsaládon belül a TREK-1 expresszálódik leginkább a központi idegrendszerben, méghozzá olyan kérgi és kéreg alatti helyeken (prefrontális kéreg, hippokampusz, striatum, amygdala), melyek kapcsolatba hozhatók a depresszió során észlelhető kognitív és emocionális zavarokkal. Ezért felvetődik a TREK-1 depresszióban betöltött esetleges szerepe. Több különböző, depressziót elemző kísérleti modellben a TREK-1 knockout egerek depresszióresztensnek bizonyultak [100]. Ezek szerint a knockout állatokban valószínűleg fokozottabb a szerotoninerg tónus, melyet meg is erősítettek a depresszióval összefüggésbe hozható régiókban [100]. Úgy tűnik tehát, hogy a TREK-1 működése a központi idegrendszer bizonyos területein szerepet játszik a depresszió kialakulásában, és az SSRI-k terápiás hatékonyságát a TREK-1 csatorna gátlása is növeli.

3.4 A mikrotubulus-affinitás reguláló kináz (MARK, microtubule-associated-protein/microtubule affinity-regulating kinase)

A MARK kinázok változatos sejtélettani funkcióinak [181-185] részletes tárgyalása meghaladná jelen Ph.D. dolgozat kereteit, ezért csak az értekezés szempontjából fontosabb elemeket emelem ki.

A MARK kinázok (MARK1-4) az AMPK rokon kinázok (AMPKrK) közé tartoznak. Szabályozó szerepük a mikrotubulus rendszer dinamikájának, stabilitásának beállításában megalapozott és elfogadott , valamint alapvető és általános meghatározói a sejtpolaritás fenntartásának például epiteliális vagy idegsejtekben. A mikrotubulus rendszert a mikrotubulus-asszociált-proteinek (pl. MAP2, MAP4, tau) foszforilációján keresztül szabályozzák [186]. Ezek a fehérjék a mikrotubulus felszínéhez asszociálódnak, annak szerkezetét stabilizálják és a depolimerizációját gátolják. Ezenfelül mint jelzőtáblák vagy úttorlaszok irányítják a mikrotubulus mentén zajló motoros fehérje-forgalmat, amely például az intracelluláris vezikulák mozgásában, így az axonális transzportban fontos. A MAP fehérjék foszforilációja csökkenti a mikrotubulus iránti affinitásukat, vagyis a depolimerizációnak kedvez. Orvosi szempontból lényeges, hogy a hiperfoszforilált tau fehérje fokozottan aggregálódik, az idegsejtekben neurofibrilláris kötegekké áll össze, ami az Alzheimer kór patogenezisének része.

Az emlős MARK kinázoknak megfelelő ortológokat először *Caenorhabditis elegans* modellállatban írták le Par-1, „partitioning defective gene 1” néven [187-188]. A Par géneket (Par 1-6) az egysejtes embrió sejtpolarizációjának fenntartásában játszott szerepük alapján azonosították. A zigótában a spermium belépése által meghatározott első és hátsó oldalon eltérő Par proteinek halmozódnak fel. Ezek kölcsönösen gátolják a másik oldalra jellemző Par fehérjék megjelenését az adott oldalon, ezzel állandósítják a kialakult polarizált állapotot. Mint később kiderült, a hasonló rendszerek a különböző polarizált sejttípusok tekintetében konzerváltak. A Par-1/MARK kináz ubikviter komponense a Par rendszernek, tehát gyakorlatilag minden polarizált sejtben megtalálható.

A MARK kinázok aktivitását szerint/treonin kinázok általi foszforiláltsága és interakciós partnerekhez történő kötődése határozza meg. A szabályozás többnyire a

MARK regulációs vagy más néven aktivációs hurok régiójának foszforilációs állapotához köthető. A munkám során használt MARK-2 aktivációs hurok régióján elhelyezkedő 208-as treonin (T208) foszforiláltsága nélkülözhetetlen a fehérje aktivitásához, ám ezzel egyidejűleg a Ser 212-nek defoszforilált állapotban kell lennie. A foszforilált S212 függetlenül a 208-as foszfotreonintól gátolja az aktivációt [189-190].

Emlősökben a T208 foszforilációját a MARKK és az LKB-1 kinázok képesek elvégezni. A MARKK azonos a TAO-1 (Thousand And One amino acid 1) néven ismert fehérjével [189], az LKB-1 egy ismert tumor szupresszor kináz, mely egy heterotrimer komplex (LKB-1/STRAD/MO25) formájában aktív [191].

A MARK1 és a MARK2 szerkezeti vizsgálata megerősítette, hogy a Ser212 foszforiláltsága befolyásolja az aktivációs hurok stabilizációját. Az enzim inaktív állapotában az aktivációs hurok behajtogatódik a katalitikus résbe, és így gátolja az ATP és a szubsztrátok bekötését [192-193]. Az aktiváció során az aktivációs hurok kihajtogatódásával újra megnyílik a katalitikus hasadék a reakció partnerek előtt [190].

A Ca^{2+}-calmodulin (CaM) dependens protein kináz I (CaMKI) a katalitikus domén két egymástól távoli helyének (a 91-93-as tripla szerin, és a 294-es treonin, a domén C terminálisához közel) foszforilációján keresztül direkt aktiváló hatással bír a kinázra [194]. A protein kináz B (PKB vagy Akt) a MARK-ra összefutó szabályozási jelpályák egyik tagján hatva, a gátlás gátlásán keresztül aktivál. A GSK3β a MARK2 aktivációs hurokrégióján elhelyezkedő S212-t foszforilálva gátolja a MARK-ot [195]. Az Akt/PKB a GSK3β (glikogén szintáz kináz 3β) gátló hatású foszforilációjával aktiválja a MARK-okat.

A Par-1/MARK kinázt az atípusos PKC/Par-6 komplex foszforilálja az úgynevezett spacer régióban (T539), ennek hatására Par-5 (14-3-3 adapterfehérje) kötődik hozzá. A MARK leválik az apikális membrándoménről és a citoplazmába kerül, az aPKC ezzel akadályozza meg a MARK funkciójának ellátását [196-198]. A 14-3-3 az előbbi, ún. relokalizációs mechanizmus mellett a MARK kináz doménjához egy foszforszerinen (S400) kötődve direkt is gátolja az enzimet. Ezt a szerint a protein kináz D (PKD) foszforilálja [198]. A MARK kinázok membránlokalizációjához hozzájárulhat, hogy a KA1 („kinase associated 1”) doménjük foszfatidilszerint köt [199]. A MARK kinázoknak nincs ismert ioncsatorna szubsztrátja.

3.5 K^+ áramok a hátsó gyöki ganglion idegsejtjeiben

A potenciálisan fájdalmas, szövetkárosító fizikai, kémiai és termális ingerek afferentációjában központi szerepe van azoknak a primer szenzoros pszeudounipoláris neuronoknak (ún. nociceptoroknak), melyek sejttestjei a hátsó gyöki idegdúcban (dorsal root ganglion, DRG) és a trigeminális ganglionban (TRG) találhatók. A DRG idegsejtek axonjai a periféria felé és a gerincvelő hátsó szarvába ágaznak, ahol felszálló pályákra kapcsolódnak át. A nociceptoroknak két fő típusát különböztetik meg, részben idegrostjaik jellemzői alapján. A kis átmérőjű, velőhüvely nélküli, lassú vezetőképességű C rostokkal rendelkező nociceptorokat polimodális nociceptoroknak is nevezik, mivel valamennyi fő fájdalomingerre képesek reagálni. A velőhüvelyes Aδ rostok vastagabbak, gyorsabb vezetőképességűek, elsősorban a gyors, éles fájdalomérzésben van szerepük (hideg, nyomás). A DRG neuronok sejttestjeinek mérete nemcsak neuritjaik átmérőjével, hanem általában funkciójukkal is korrelál: a kis átmérőjű neuronok elsősorban nociceptor funkcióval rendelkeznek, míg a nagyobb, de kisebb arányban jelenlévő sejtek a helyzetérzékelés (propriocepció) mellett a finom nyomás és vibráció érzékeléséért felelősek.

A DRG és TRG neuronokban jelenlevő ioncsatornák régóta intenzív vizsgálatok tárgyát képezik, hiszen a fájdalom csillapításának lehetséges célpontjai. Terápiás szempontból is fontos, hogy számos K^+ csatorna funkcionális jelenlétét igazolták ezen idegdúcokban. A K^+ csatornákon folyó áram csökkenti a neuronok ingerlékenységét, hiperpolarizálja vagy stabilizálja a membránpotenciált, így ezen K^+ áramok a kórosan fokozott ingerlékenységet vagy aktivitást mérsékelhetik.

Az elérhető adatok többsége rágcsálókból származó primer sejttenyészetekre vonatkozik, vannak azonban humán DRG és TRG eredetű sejtvonalakkal is eredmények. Az egyedfejlődési stádium [200-201] mellett számos egyéb tényező is meghatározza az egyes fehérjemolekulák, így a DRG/TRG neuronok potenciális ioncsatornáinak kifejeződését. A neuronális ioncsatornák expressziójának szabályozásában a neurotrophinoknak fontos szerepet tulajdonítanak [201]. Krónikus fájdalom és gyulladás során a feszültségfüggő Na^+ csatornák kórosan fokozott kifejeződése („upreguláció”) mellett megváltozik több K^+ csatorna expressziója is (diszreguláció), melynek hátterében részben a megemelkedett idegsejt növekedési

faktor (nerve growth factor, NGF) szint áll [201]. A csökkent expressziójú („downreguláldott”) K^+ csatornák (sejt)specifikus aktivátorai a fájdalom kezelésének fontos elemei lehetnek, sőt, van is olyan használatban lévő fájdalomcsillapító (diklofenák), melynek fő hatásmechanizmusát kiegészítheti a DRG bizonyos feszültségfüggő K^+ csatornáinak stimulációja [202]. Tehát lényeges terápiás vonatkozással bír a sokféle K^+ csatorna funkcionális jelenléte a DRG és TRG idegsejtjeiben.

3.5.1 Feszültségfüggő K^+ csatornák (K_v)

A Kv csatornák az akciós potenciál repolarizációs fázisában vesznek részt, így az AP alakjára és frekvenciájára hatnak. A DRG axonjaiban gyorsan aktiválódó (”gyors”) K^+ áramokat a K_v1/KCNA (Shaker) típusú csatornák közvetítik, míg a lassan aktiválódó (”lassú”) K^+ áramért a K_v7/KCNQ csatornák felelősek [203]. A gyors K^+ áram legalább két további csoportra bontható: a lassan inaktiválódó, klasszikus, késői-rektifikáló K^+ csatornák (K_{DR}, delayed rectifier) közé a $K_v1.1$, $K_v1.2$, a $K_v2.1$ és a $K_v3.1$ tartozik, míg a gyorsan inaktiválódó ún. „A”-típusú áramokért (K_A) főként a $K_v1.4$ felelős.

A korábban M-áramként ismert axonális, lassú K^+ áramok nem inaktiválódnak, és a $K_v7.2$ homomerek vagy $K_v7.2/K_v7.3$ heteromerek hozzák őket létre. Elsősorban az ingerlékenység szabályozásában van szerepük. A nagy átmérőjű mechanoreceptív és proprioceptív DRG neuronokban főleg a $K_v1.1$, $K_v1.2$ és $K_v7.2$ fejeződik ki, míg a kis átmérőjű idegsejtekben a $K_v1.4$ és $K_v7.2/K_v7.3$ [203].

Patkányokon igazolták a kis átmérőjű DRG neuronokon kifejeződő $K_v3.4$ gyorsan inaktiválódó K^+ csatornák gerincvelő-sérülést követő hiperszenzitivitásban és fájdalomban betöltött szerepét, ami kezdetben a kóros inaktiváció, később a csökkent sejtfelszíni expresszió révén alakul ki [204].

3.5.2 Kalcium-aktivált K^+ csatornák

A nagy vezetőképességű (big, maxi conductance) BK_{Ca} csatornák is hozzájárulnak a DRG neuronok K^+ áramához és a krónikus fájdalomra jellemző kóros ingerlékenységhez. Patch clamp technikával felnőtt patkány bőr fájdalomérzékelő afferens DRG neuron populáció jelentős hányadában mértek BK_{Ca}-áramot, túlnyomórészt a kisméretű, izolektin B4 (IB4) pozitív szubpopulációban. A BK_{Ca} csatorna repolarizációban betöltött funkciója mellett az ingerlékenység meghatározásban is lényeges tényező [205]. Egy másik tanulmány arról számol be, hogy szintén patkányban patch clamp mérésekkel elsősorban kis- és közepes méretű DRG neuronokban mértek BK_{Ca}-áramot [206]. Továbbá a perifériás idegsérülés okozta neuropátiás fájdalom során kisebb BK_{Ca} aktivitást és a csatornák csökkent mértékű expresszióját mutatták ki, amit az egyidejűleg megemelkedett agyi eredetű neurotrofikus faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) szinttel hoztak összefüggésbe [206]. Ugyancsak patch clamp mérésekkel, valamint koimmunprecipitációval és immunfluoreszcens módszerrel igazolták, hogy patkány DRG neuronokban a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) és BK_{Ca} csatorna funkcionálisan és fizikálisan is komplexet alkot [207]. A számos fizikai, kémiai ingerre (pl. kapszaicin (vanilloidok), magas hőmérséklet, savas pH, ozmotikus és nyomásváltozások) megnyíló TRPV1 nem specifikus kationcsatornán beáramló Ca^{2+} ionok aktiválják a BK_{Ca} csatornát, mely a K^+-kiáramlással (részben) ellensúlyozza a TRPV1 aktiváció depolarizáló hatását [207].

Az ép humán DRG neuronok többségén kis és közepes konduktanciájú (small, intermediate) SK1- és IK1 immunoreaktivitás mutatható ki, mely akut és krónikus sérülést követően csökken [208]. Immuncitokémiával és western blot technikával patkány DRG idegsejteken mindhárom SK és az IK csatorna jelenléte is igazolt, és az SK3 kivételével elsősorban a kisméretű nociceptorokban fordulnak elő [209].

3.5.3 Befelé rektifikáló K^+ csatornák (K_{ir})

Elektrofiziológiai és immunológiai módszerekkel patkány DRG neuronokon K_{ATP} csatornákat ($K_{ir}6.2$ és SUR1/2 alegységeket) azonosítottak, de ezek nagyobb P_o-val és nyitvatartási idővel jellemezhetők a nagyméretű sejtekben [210]. Gerincvelői ideglekötést követően azonban csak a hiperalgéziás (fokozott fájdalomérzést mutató) állatok kizárólag nagy átmérőjű sejtjeiben csökkent a K_{ir} áramaktivitás, a kisméretű sejtekben axotómia után sem csökkent, ill. a „nem-hyperalgéziás" állatok egyik neurontípusában sem történt a K_{ir} aktivitásában változás. Egy szisztematikus tanulmányban felnőtt patkány DRG neuronokban elektrofiziológiai és viselkedési tesztekkel támasztották alá a K_{ATP} csatorna funkcionális jelentőségét [211]. Különböző, a központi idegrendszerbe juttatott K_{ATP} csatorna agonistákkal szignifikánsan csökkent a bradikinin, valamint a mechanikai- és hőingerek által kiváltott fájdalomelhárító (nocifenzív) viselkedés, csökkent továbbá a DRG neuronok bradikinin által kiváltott fokozott ingerlékenysége is. Ezen hatások K_{ATP} csatorna antagonistákkal gátolhatónak bizonyultak.

3.5.4 K_{2P} csatornák

Több független tanulmányban is azonosították a TRESK, TREK-1, TREK-2, TRAAK, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TWIK-1 és TWIK-2 csatornák mRNS-ét patkány DRG-ben [1;78;128;212], és egy-egy tanulmányban a THIK-1 és THIK-2 mRNS-ét is [1;212]. Krónikus fájdalmat modellező kísérletekben több K_{2P} csatorna mRNS-ének is megváltozik az expressziója, ami magyarázatul szolgálhat az erre az állapotra jellemző fokozott ingerlékenységű idegsejtek jelenlétére. Azonban a DRG idegsejteken funkcionálisan is megjelenő, azaz a mérhető K_{2P} áramok közül csak a TREK-1, TREK-2, TRESK és TRAAK csatornák jelenlétét sikerült igazolni újszülött patkányban, single channel mérésekkel [78;84]. Az mRNS-ek mennyisége mellett meghatározták az egyes háttér K^+ áramok arányát 37 és 24 °C-on, és fiziológiás hőmérsékleten döntően a TREK-2 árama (69%) adja a DRG idegsejtek háttér K^+ áramát, majd csökkenő sorrendben a TRESK (16%), TREK-1 (12%) és TRAAK (3%)

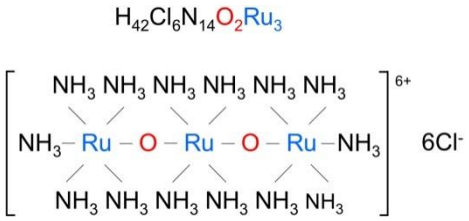
következnek. Azonban 24 °C-on gyakorlatilag csak a TRESK áram azonosítható, mivel a termoszenzitív TREK csatornák aktivitása ezen a hőmérsékleten már nem számottevő.

A DRG neuronok vizsgálatát nehezíti, hogy a hátsó gyöki ganglionból nyert sejtizolátum heterogén. A különböző (szub)modalitások érzékeléséért felelős idegsejtek nemcsak méretükben térnek el, hanem különböző ioncsatorna készlettel rendelkeznek, melyet szépen példáz a TRP csatornák specifikus funkciója és ennek megfelelő szelektív kifejeződése a különböző primer érzőneuron szubpopulációkban. Valószínűleg a szelektív expresszió – bizonyos mértékben – kiterjed a K_{2P} csatornákra is. Ezért felmerül a lehetőség, hogy az általában nagy mennyiségben jellemző TREK-2, TRESK, TREK-1 és TRAAK csatornákon kívül egyes sejtpopulációkban az egyébként általában minor komponensként jelenlévő más K_{2P} csatornák is jelentősek lehetnek. A közelmúltban egerekben a TRPM8 termoszenzitív (mentollal aktiválható) nem-szelektív kationcsatornát expresszáló DRG neuronokban a TASK-3 kifejeződését mutatták ki [213]. A TASK-3 csatornák gátlása magasabb hőmérséklet irányába tolja a hidegérzékelés küszöbét, és ennek megfelelően a TASK-3 knockout egereket fokozott hidegérzékenység jellemzi [213].

A TREK-2, TRESK, TREK-1 és TRAAK csatornák mRNS-e kétségkívül nagy mennyiségben van jelen a DRG neuronok keverékéből izolált teljes RNS-ben, és a csatornák egyedi csatorna szinten megtalálhatók a legtöbb vizsgált neuron sejttest membránjában, azonban a csatornák megoszlása sejttípusokként, illetve azok esetleg specifikus szubcelluláris lokalizációja (pl. soma, perifériás vagy centrális nyúlvány) alig ismert. Szintén nem tudjuk biztosan, hogy miért van szükség ennyiféle K_{2P} csatorna kifejeződésére. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a különböző csatornák eltérő szabályozása lényeges, és ezek különböző jelpályákat vagy szabályozó tényezőket kapcsolnak a funkció szempontjából meghatározó membránpotenciálhoz. Nagyban akadályozza az egyes csatornák jelentőségének megértését, hogy ezek nagyon hasonló háttér K^+ áramot hoznak létre, és az áramok elkülönítésére kevés farmakológiai eszköz áll rendelkezésre. Különösen az azonos alcsaládba tartozó, nagy aminosav-szekvencia-hasonlóságot mutató csatornák, például a TREK-1 és TREK-2 áramának elkülönítése tűnik nehezen kivitelezhetőnek.

3.6 A ruténiumvörös ioncsatornákra és a sejt kalciumháztartására kifejtett hatásai

A többszörösen pozitív töltésű ruténiumvörös (RR) három ruténiumatomot két oxigénatomon keresztül összekapcsoló vázat tartalmaz, melyben a középső ruténiumhoz négy, a szélsőkhöz öt-öt NH_3-csoport kapcsolódik. A hat pozitív töltést kloridionok ellensúlyozzák („ammonizált ruténium-oxiklorid”; 6. ábra). Kezdetben szövettani festékként terjedt el, mert a bíborvörös vegyület igen jól kötődik a negatív töltésű sejtalkotókhoz, különösen a felületi glikokonjugátumokhoz, és az elektronmikroszkópiában is használható további jelzőanyagok hozzáadása nélkül [214].



6. ábra: A ruténiumvörös molekula összegképlete és szerkezete.

Ez a viszonylag nagy, polikationos molekula, melyre a biológiai membránok impermeábilisak, számos kalciumtranszportban résztvevő és kalciumkötő fehérjével lép kölcsönhatásba. Megfelelő alkalmazással a sejtbe juttatva vagy permeabilizáció esetén intracelluláris alkotókhoz is képes kötődni. Ily módon gátolja a mitokondriális kalciumfelvételért felelős uniportert (MCU), melynek két TM doménját összekötő régióján belüli negatív töltésű aminosavakkal lép kölcsönhatásba [215-216], valamint a mitokondrium külső membránjában elhelyezkedő a kalciumtranszportért is felelős feszültségfüggő anioncsatornát (voltage-dependent anion channel: VDAC) [217-218]. Emellett az RR gátolja a rianodin receptort (endoplazmatikus retikulum Ca^{2+}-csatorna) [219] és a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+}-ATPázt (SERCA) is [220]. Gátolja továbbá a plazmamembrán kalciumpumpáját [221], a feszültségfüggő kalciumcsatornákat [222], a jelentős mértékben kalciumpermeábilis nem szelektív kationcsatornát, a TRPV1-et (kapszaicin/vanilloid 1 receptor) [223], és az epiteliális kalcium csatornákat (ECaC) [224]. Emellett különféle kalciumkötő fehérjékhez is

kapcsolódik, mint a kalszekvesztrin, kalretikulin, troponin, így ezek működését is befolyásolhatja [225].

A BK_{Ca} kalcium-aktivált csatornát az intracellulárisan adott RR gátolja [226], valószínűleg a BK_{Ca} kalciumkötő régiójával lép interakcióba [227]. Azonban az RR teljesen kalcium-független módon is képes kölcsönhatásra néhány K_{2P} csatornával egy munkacsoportunk által közölt tanulmány szerint. Az extracellulárisan adott festék a mellékvesekéreg glomerulosa sejtek háttér K^+ és L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} áramát gátolta [228]. Mivel a glomerulosa sejtek háttér K^+ áramát túlnyomórészt a TASK, ill. bizonyos fajokban a TREK K_{2P} csatornák biztosítják [49;174], így munkacsoportunk megvizsgálta ezen alcsaládokba tartozó csatornák ruténiumvörös érzékenységét. A TASK-3 és a TRAAK csatorna áramát gátolja az extracellulárisan adott festék, míg a közeli rokon TASK-1 és TREK-1 csatornák árama rezisztens [52]. A közeli rokon TASK-1 és TASK-3 eltérő RR-szenzitivitását felhasználva kimutatták, hogy a TASK-3 a domináns háttér K^+ áram patkány glomerulóza sejtekben [175], valamint hogy a TASK-1/TASK-3 heterodimer létrejön *Xenopus* petesejtekben [52]. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a TASK-3 RR-érzékenységét döntően egyetlen aminosav, a 70-es pozícióban található negatív töltésű glutamát határozza meg (E70). A fél-maximális gátló koncentráció szubmikromólos nagyságrendű (0,7 μM), valamint a Hill koefficiens 1,0. Így elképzelhető, hogy egy RR molekula egy TASK-3 homodimerrel lép – feltehetően elektrosztatikus – kölcsönhatásba [229]. A TASK-1 70-es pozíciójában pozitív töltésű lizin (K) található, ez magyarázza, hogy miért nem hat rá a szintén pozitív RR. Ha azonban a TASK-1 70-es lizinjét glutamátra cseréljük, akkor az így létrehozott, pontmutációt tartalmazó TASK-1 K70E már érzékeny ruténiumvörösre. Ennek megfelelően, ha a TASK-3 E70-t pozitív töltésű argininre (E70R) vagy semleges ciszteinre (E70C) cseréljük, akkor a TASK-3 elveszti ruténiumvörös-érzékenységét, nem alakul ki gátlás. Vad és többféle mutáns tandem TASK-3 csatornák segítségével azt is kimutatták, hogy mindkét alegység glutamátja szükséges a gátlás létrejöttéhez, valamint ezzel összhangban az in vivo is megtalálható TASK-1/TASK-3 heteromer nem gátolható ruténiumvörössel. Az RR a TRAAK csatornát is erőteljesen gátolta, az IC_{50} 2 μM-nak adódott [52]. A Hill koefficiens viszont 2,1 volt, tehát a gátlás meredekebb dózis-hatás görbével jellemezhető, és ez eltérő hatásmechanizmusra, több gátlóhely jelenlétére utalt. A többi K_{2P} csatorna RR- érzékenysége ekkor még nem volt ismert.

4. Célkitűzések

1. A DRG és TRG neuronok egyik legjelentősebb háttér K^+ áramát biztosító TRESK csatorna kalcineurin általi nagyfokú aktivációját eddig csak *Xenopus* petesejtben, heterológ expressziós rendszerben sikerült igazolni. Így adódik a kérdés, hogy ugyanez a szabályozási mechanizmus működik-e emlős sejtekben is, sejtvonalban expresszálva a csatornát.

2. A TRESK aktivációja során defoszforilált szerin cluster refoszforilációjáért felelős kináz(ok) azonosítása és vizsgálata *in vitro* és heterológ expressziós rendszerben.

3. Annak szisztematikus vizsgálata, hogy a többszörösen pozitív töltésű ruténiumvörös (RR) hogyan hat az egyes – *Xenopus* petesejtben kifejezett – K_{2P} csatorna áramokra, abból a célból, hogy az RR felhasználható legyen a csatornák farmakológiai azonosítására.

4. Amennyiben létezik RR-érzékeny K_{2P} csatorna (a TASK-3 és TRAAK csatornákon kívül), terveztük a hatásmechanizmus feltárását, a dózis-hatás görbe meghatározását, valamint a lehetőségekhez mérten a festék hatásának kimutatását natív sejtben expresszálódó csatornán.

5. Módszerek

5.1 Felhasznált anyagok, oldatok

A kísérletekben használt analitikai tisztaságú vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Fluka (Milwaukee, WI, USA) és Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) cégektől vásároltuk, a tranziens transzfekcióhoz szükséges Lipofectamine 2000 és Opti-MEM® (csökkentett szérumtartalmú Minimal Essential Medium (MEM)) tápfolyadék az Invitrogen™ Life Technologies-tól (Carlsbad, CA, USA) származott. A sejttenyésztéshez használt flaskák és sejttenyésztő edény a Greiner Bio-One GmbH (Kremsmuenster, Ausztria), a Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM), Ham's Nutrient Mixture F12 és a fötális borjú szérum (FBS) a Lonza cég (Basel, Svájc) termékei voltak. A Pfu DNS polimeráz és reverz transzkriptáz enzimeket a Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) cégtől vettük. Az in vitro irányított mutagenezishez a Stratagene (La Jolla, CA, USA) QuikChange site-directed mutagenesis készletét használtuk, néhány egyéb enzimet és készletet az Ambion (Austin, TX, USA) és New England Biolabs (Beverly, MA, USA) cégektől vásároltunk.

A patch clamp mérésekhez használt ionomycint (kalcium só, Merck) és FK506-ot (Sigma) 5 mM-os törzsoldatban (DMSO-ban oldva) -20 °C-on tároltuk, és közvetlenül a felhasználás előtt hígítottuk a magas K^+ tartalmú mérőoldattal a kívánt koncentrációra.

5.2 Petesejtek preparálása, injektálása

Élő állatot is igénylő, a Ph.D. munkám során alkalmazott valamennyi kísérleti protokollt a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi és Etikai Bizottsága által jóváhagyott (XIV-I-001/2154-4/2012) engedélyben leírtak szerint, és minden egyéb, az állatvédelemre vonatkozó intézményi és törvényi szabályozást betartva hajtottunk végre. Az általunk felhasznált afrikai karmosbékákat (*Xenopus laevis)* a szokásos módon, folyamatosan cserélődő és szűrt vizű 50 l-es tankokban tartottuk 19 °C-os (légkondicionált) helyiségekben.

Felnőtt békákból benzokainos (0,03%) érzéstelenítést követően petefészeklebenyeket távolítottunk el. A lebenyeket nominálisan Ca^{2+}-mentes, enyhén hipozmotikus oldatba (OR2: NaCl 82,5 mM; KCl 2 mM; $MgCl_2$ 1 mM; HEPES 5 mM; pH 7,5 (NaOH)) helyeztük, majd 1-es típusú kollagenázzal (1,45 mg/ml, 148 U/mg, type I; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) OR2-ben 18 °C-on, lassan forgatott csövekben emésztettük először 20 percig, majd újabb 15 percig friss emésztőoldatban. Végül oldatcsere nélkül gyorsan forgatva még 10 percig. Ezután OR2-vel többször is átöblítettük a lebenyeket. Az emésztés következtében a lebenyt összetartó kötőszövet és a petesejteket borító apró vérereket is tartalmazó follikuláris réteg fellazult, és a kb. 1-1,3 mm átmérőjű (V. és VI. érési stádiumú) petesejtekről a follikuláris réteget manuálisan távolítottuk el. A petesejteket a továbbiakban az injektálás és a mérés előtt is 18 °C-on billegtetve tartottuk módosított Barth's oldatban (MBK), mely a következő összetételű volt (mM-ban): NaCl 88; KCl 1; $NaHCO_3$ 2,4; $MgSO_4$ 0,82; $Ca(NO_3)_2$ 0,33; $CaCl_2$ 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 petesejteket egy nappal a follikuláris réteg eltávolítása után az animális póluson injektáltuk 50 nl (változó mennyiségű, 57 pg – 2,3 ng/pete) cRNS-sel egy kb. 30 µm átmérőjű üvegkapillárison át, Nanoliter Injector (World Precision Instruments) segítségével. Naponta, ill. szükség esetén akár gyakrabban is lecseréltük a petékről az MBK-oldatot. Az elektrofiziológiai méréseket 2-4 nappal az injektálás után végeztük.

5.3 Felnőtt egér DRG preparálása, disszociált neuronkultúra előállítása

A kísérletekhez szükséges NMRI (Naval Medical Research Institute) egereket a Toxicoop Zrt.-től (Budapest) vásároltuk. A ganglionok kipreparálása előtt az egereket napi 12 órás megvilágítás, valamint ad libitum ivóvíz- és takarmány-hozzáférés mellett tartottuk. A 40-70 napos állatokat CO_2 belélegeztetésével túlaltattuk, a háti, ágyéki szakasz spinális ganglionjait eltávolítottuk, és 4 °C-os PBS-be (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM NaH_2PO_4; pH 7,4 (NaOH)) helyeztük. 1,5 ml PBS-t 2 mg/ml 1-es típusú kollagenázzal kiegészítve (type I; Worthington, Lakewood, NJ, 148 U/mg) a ganglionokat 37 °C-on 30 percig finom keverés mellett vízfürdőben tartottuk. Ezt követően 100 U/ml penicillint és 0,1 mg/ml streptomycint (Sigma), valamint 10% FBS-t

tartalmazó 1,5 ml DMEM és a Ham's Nutrient Mixture F12 1:1 arányú keverékébe (DMEM/F12) helyeztük a részlegesen emésztett idegdúcokat, és óvatosan, műanyaghegyű levágott végű 1 ml-es automata pipettával 10-15 alkalommal trituráltuk, ami a sejtek szöveti kötelékből való kiszabadulását eredményezi, és a disszociált sejtkultúra előállítását teszi lehetővé. Az így nyert sejt- és extracelluláris mátrixtörmeléket is tartalmazó sejtszuszpenziót a fent említett összetételű tápfolyadékkal 5 ml-re kiegészítve centrifugáltuk (200 g, 5 perc, szobahőmérséklet), és a felülúszó óvatos eltávolítása után 5 ml friss tápfolyadékot töltöttünk a lecentrifugált sejtekre, majd újra centrifugáltuk. Ezt a „mosási eljárás"-t még legalább kétszer megismételtük, majd a disszociált DRG neuronokat és gliasejteket is tartalmazó sejtszuszpenziót poli-L-lizinnel kezelt műanyag, 35 mm átmérőjű sejttenyésztő edények közepére cseppentettük, és 37 °C-on 95% levegőt és 5% CO_2-t tartalmazó gázkeverékben termosztáltuk. Megvárva, hogy megfelelően letapadjanak a sejtek (a „kicseppentéstől" számítva legalább 2 óra múlva), óvatosan 2 ml-re feltöltöttük az edényeket tápfolyadékkal, és a mérésig CO_2 inkubátorban tartottuk a sejtpreparátumot. A méréseket a letapadás után, a preparálástól számított 72 órán belül végeztük.

5.4 Sejtvonalak, sejttenyészetek

A felnőtt egerek hátsó gyöki ganglionjaiból előállított primer sejttenyészetet a már említett 100 U/ml penicillint és 0,1 mg/ml streptomycint (Sigma), valamint 10% FBS-t tartalmazó DMEM/Ham's F12 (1:1 v/v) tápfolyadékban tartottuk fent, melyet naponta cseréltünk. Az ATCC-LGC (Wesel, Németo.) cégtől vásárolt, igen hatékonyan transzfektálható *ember embrionális vese 293* (HEK293: human embryonic kidney; ATCC-CRL-1573) sejtvonalat 100 U/ml penicillint és 0,1 mg/ml streptomycint (Sigma), valamint 10% FBS-t tartalmazó DMEM tápfolyadékban 25, ill. 50 ml-es műanyag sejttenyésztő flaskákban tartottuk fent.

5.5 Tranziens transzfekció

A HEK293 sejteket egér TRESK csatorna cDNS-ét tartalmazó pIRES-CD8 DNS plazmiddal transzfektáltuk, melyhez Lipofectamin 2000 transzfekciós reagenst

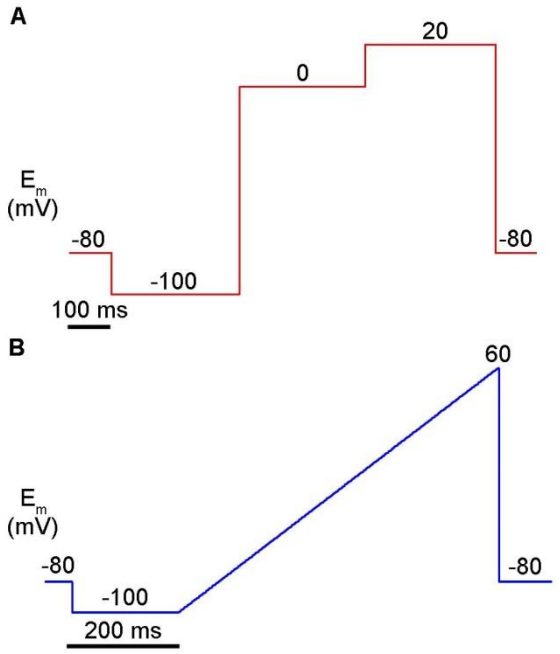
(Invitrogen) használtunk az előírt protokoll szerint (1 µg DNS és 2 µl transzfekciós reagens arányban). A kísérleteket a transzfekciót követő 36-72 órában végeztük, amikor a sejtfelszínen is megjelenő, tranziensen expresszált csatornák mennyisége a legnagyobb volt a mérhető háttér K^+ áram alapján.

5.6 Két-elektródos voltage clamp mérések

A *Xenopus* petesejtek teljes membránfelületén átfolyó áramot két-elektródos feszültségzár (voltage clamp) módszerrel mértük OC-725C erősítő (Warner Instrument Corp., Hamden, CT) segítségével. Az extracelluláris (EC) elhelyezkedésű oldat 2 vagy 80 mM [K^+]-t tartalmazott, melyekben a [K^+] és [Na^+] összege állandó, 97,4 mM volt, továbbá mind az alacsony, mind a magas [K^+]-jú oldat tartalmazott még 1,8 mM $CaCl_2$-ot és 5 mM HEPES-t (a pH-t 7,5-re állítottuk NaOH-dal). Hidrosztatikai nyomáskülönbségre alapozott perfúziós rendszerrel az EC oldatot folyamatosan cseréltük a mérendő sejt körül. A 3 M-os KCl-dal megtöltött intracelluláris mikroelektródokat boroszilikát üvegből (BF120-94-10, Sutter Instruments) úgy húztuk (P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument Co., Novato, CA), hogy ellenállásuk 0,3-1 MΩ közé essen. Az elektrofiziológiai méréseinkből nyert adatokat 1 kHz-en szűrve 1-2,5 kHz-es mintavételezési frekvenciával Digidata Interface 1200 (Axon Instruments, Foster City, CA) analóg-digitális átalakítón keresztül juttattuk személyi számítógépre, melyen a pClamp 10.1 szoftvercsomag (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) komponenseivel regisztráltuk és értékeltük ki őket. A befelé irányuló háttér K^+ áramot a magas [K^+]-jú oldatban mértük egy 4 másodpercenként ismétlődő, 300 ms hosszú -100 mV-os feszültséglépés végén, melyből az ugyanezen paraméterek mellett, de alacsony [K^+]-jú oldatban mért értéket kivontuk. A tartófeszültséget 0 mV-ra állítottuk a magas K^+ koncentrációjú oldatban negatív membránpotenciálon jelentkező tartós nagy áram elkerülésére, a feszültségprotokoll a 7. ábra A paneljén látható. A kísérleteket szobahőmérsékleten (21 °C) végeztük.

Nem, vagy desztillált vízzel injektált petesejten az általunk alkalmazott módszerrel legalább egy nagyságrenddel kisebb amplitúdójú endogén K^+ áram (100-200 nA) mérhető, mint a különböző K_{2P} csatornákat kódoló cRNS-sel történt injektálást követően (>1-2 µA).

Az aktivált TRESK áram %-ban kifejezett visszaállását a kiindulási szintre (lecsengését) minden mérésnél a következőképpen számoltuk: 100% a visszaállás, ha értéke megegyezik a kezelést közvetlenül megelőző magas [K^+]-jú oldatban mért (alap)árammal, míg 0% az ionomycinnel végzett kezelés végén mért aktiválódott (de maximumát esetleg még nem elérő) áram. Többnyire az áramaktiváció kezdetétől számítva 10 percig mértük az áram változását a magas [K^+]-jú oldatban, mely során az ionomycinnel végzett stimuláció 2 vagy 3 percig, a karbakollal történő 3 percig tartott. Ahol nem az idő függvényében ábrázolom a %-ban kifejezett visszaállást, ott az aktiválás kezdetétől számolt 10. perc végén mért értékeket adom csak meg, de ezt az adott ábrafeliratban is tisztázom.



7. ábra: Az elektrofiziológiai mérések során használt feszültségprotokollok
(A) A két-elektródos voltage clamp mérések feszültségprotokollja. Az itt bemutatott feszültséglépések (step) sorozata 4 másodpecenként ismétlődött, melyek között a tartófeszültséget 0 mV-ra állítottuk. **(B)** A patch clamp mérések feszültségprotokollja feszültséglépéseket (step) és egyenletes feszültségváltoztatást (ramp) is tartalmaz. A protokoll 2 másodpercenként ismétlődő ciklusai között a tartófeszültséget -80 mV-ra rögzítettük.

5.7 Patch clamp mérések

A HEK293 sejteken és az egér DRG neuronokon a patch clamp méréseket teljes-sejt (whole-cell) felállásban, feszültségzár módban végeztük. A mérőpipettákat

boroszilikát üvegből (BF120-94-10) húztuk P-87 pipettahúzó készülékkel (Sutter Instruments), majd a hegyüket további hőkezeléssel (ún. polírozással) simábbá, és kisebb átmérőjűvé alakítottuk. A sejtmembrán és a pipettahegy között kialakított nagy ellenállású összetapadás (gigaseal) a sikeres mérések kezdetén (cell-attached felállásban) kb. 10 GΩ nagyságrendű volt. A patch pipetta az Axopatch-1D (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA) patch-clamp erősítő bemenetéhez csatlakozott. A befelé irányuló háttér K^+ áramot a 30 mM [K^+]-jú oldatban mértük egy 2 másodpercenként ismétlődő, 200 ms hosszú -100 mV-os feszültséglépés végén, melyből az ugyanezen paraméterek mellett, de az alacsony [K^+]-jú oldatban mért értéket kivontuk. A tartófeszültséget -80 mV-ra állítottuk, a feszültségprotokoll a 7./B ábrán látható. Az adatokat 1 kHz-en szűrve 2 kHz-es mintavételezési frekvenciával Digidata Interface 1200 (Axon Instruments) analóg-digitális átalakítón keresztül juttattuk személyi számítógépre, majd a pClamp 10.1 szoftvercsomag (Molecular Devices) segítségével analizáltuk őket.

A HEK293 sejtvonal sikeresen transzfektált sejtjeit a csatornával koexpresszált CD8 marker segítségével azonosítottuk. A sejttenyészethez mikrogyöngyöket adtunk, melyek felületére anti-CD8 ellenanyagot kapcsoltak (Dynabeads anti-CD8, Dynal, Waltham, MA USA). A megjelölt (min. 1-2 gyöngy/sejt), szomszédos sejttel nem érintkező sejteken mértük az egér TRESK csatornán folyó áramot. A mérőoldatok összetételét az 1. táblázat tartalmazza. Az emelt (30 mM) K^+ koncentrációjú EC oldatban a megfelelő mennyiségű Na^+-t K^+-mal helyettesítettük, hogy a két kation koncentrációjának összege változatlan maradjon. Az ionomycin-kezelést kalciumot (2 mM) is tartalmazó EC oldatban végeztük, amely nem tartalmazott EGTA-t, és a $MgCl_2$ koncentrációját az ozmolaritás fenntartása végett 0,5 mM-ra csökkentettük. A mérőpipetták ellenállása intracelluláris (IC) oldattal töltve 4-9 MΩ közé esett. Egyes kísérletekben (az adott helyen jelzem) az ATP-t és a GTP-t kihagytuk a pipettaoldatból.

A DRG neuronokon 37 °C-on, teljes-sejt patch clamp technikával mértünk háttér K^+ áramot. Az EC oldatok összetétele megegyezett a HEK293 sejtekhez használt, Ca^{2+}-ot tartalmazó EC oldatokéval. A mérőpipetták ellenállása intracelluláris (IC) oldattal töltve 3-9 MΩ közé esett. A pipettaoldat (IC oldat) összetétele az 1. táblázatban megtalálható, DRG jelöléssel. Az adatokat a HEK293 sejteknél már ismertetett módon digitalizáltuk, és dolgoztuk fel.

1. táblázat: Az elektrofiziológiai mérések során használt oldatok

A

	Patch clamp oldatok						
	Pipetta oldatok			Fürdő (EC) oldatok			
				Ca^{2+} -mentes		Ca^{2+} tartalmú	
Összetevők (mM)	*ATP-vel, GTP-vel*	*ATP és GTP nélkül*	*DRG*	*alacsony* $[K]^+$	*magas* $[K]^+$	*alacsony* $[K]^+$	*magas* $[K]^+$
NaCl	–	–	–	**140**	**112**	**140**	**112**
KCl	**140**	**140**	**135**	**2**	**30**	**2**	**30**
$CaCl_2$	–	–	–	–	–	**2**	**2**
$MgCl_2$	**3**	**3**	**2**	**2,5**	**2,5**	**0,5**	**0,5**
glükóz	–	–	–	**11**	**11**	**11**	**11**
HEPES	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
EGTA	**0,05**	**0,05**	**1**	**0,05**	**0,05**	–	–
Na_2ATP	**1**	–	**2**	–	–	–	–
Na_2GTP	**0,1**	–	–	–	–	–	–
pH	**7,3**	**7,3**	**7,3**	**7,4**	**7,4**	**7,4**	**7,4**
Felhasználás	HEK293	HEK293	DRG	HEK293		HEK293, DRG	

B

	Voltage clamp oldatok		
	Pipetta oldat	Fürdő (EC) oldatok	
Összetevők (mM)		*alacsony* $[K]^+$	*magas* $[K]^+$
NaCl	–	**95,4**	**17,4**
KCl	**3 M (!)**	**2**	**80**
$CaCl_2$	–	**1,8**	**1,8**
HEPES	–	**5**	**5**
pH	–	**7,5**	**7,5**

5.8 Plazmidok előállítása

A kísérletek során használt humán és egér TRESK, egér TASK-1/2/3, TREK-2, TALK-1, THIK-1 és az S264E mutáns egér TRESK csatornákat munkacsoportunk korábban klónozta [68;99]. A humán és egér TRAAK, TREK-1 és humán TREK-2 csatornákat tartalmazó plazmidokat [42;45;112] Prof. Michel Lazdunski és Dr. Florian Lesage bocsátotta rendelkezésünkre. A HEK293 sejteket pIRES-CD8-TRESK vektorral [42] transzfektáltuk, melyben az inzert az egér TRESK kódoló régiója volt. A *Xenopus* petesejtek injektáláshoz a megfelelő csatornát kódoló cDNS-t a pXEN *Xenopus* petesejt expressziós vektorba (Genbank EU267939) klónoztuk, majd erről cRNS-t szintetizáltunk. A cRNS in vitro előállítása az Ambion mMESSAGE mMACHINE T7 In vitro Transcription készletével történt. Előtte a templát DNS-t a kódoló régiót követő

ponton restrikciós endonukleázzal linearizáltuk, és proteináz-K emésztéssel RNáz-mentesítettük. A szintézis végén pedig a termékeket denaturáló, formaldehides agarózgélen megfuttatva etídium-bromiddal festve ellenőriztük, hogy keletkezett-e megfelelő mennyiségű RNS.

Az adenozin-monofoszfát (**A**MP) által aktivált **p**rotein **k**inázok (AMPK) és a tau cDNS-eit reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével sokszorosítottuk. A klónozás első lépéseként különböző egér szervekből és szövetekből a teljes RNS tartalmat TRIzol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA) izoláltuk, majd reverz transzkripcióval az agyból a BRSK1, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4, NUAK1 és tau fehérjéket, az embrióból a SIK1 fehérjét a 343. aminosaváig, a heréből az AMPKα1-t és a placentából a MELK-et állítottuk elő. A reverz transzkripcióhoz a Moloney murine leukemia vírus reverz transzkriptázt (MMLV-RT, Revertaid, Thermo Scientific) használtuk. A MARK1 és MELK PCR termékeket Ultra Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) DNS polimerázzal sokszorosítottuk, míg a többi kináz és a tau fehérje cDNS-ét Pfu polimerázzal (Thermo Scientific). A MARK2 722 aminosavat tartalmazó 2-es izoformáját klónoztuk (Genebank NP_001073857) meg, de ezt röviden csak MARK2-ként jelöltük, és minden kísérletben ezzel dolgoztunk. A tau és a kinázok cDNS-eit pXEN vektorba klónoztuk, és automata szekvenálással ellenőriztettük (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). A különböző mutáns fehérjéket a QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) felhasználásával állítottuk elő a gyártó utasításai szerint.

Az in vitro kísérletekben használt mutáns MARK2-T208E és MARK2-T208E/T539A kódoló régióit a pGEX2TK4T1 és a pET32-ΔKpn plazmidokba [90] szubklónoztuk, és a mutáns kinázok glutation-S-transzferáz (GST)- vagy tioredoxin-hexahisztidin (Trx-His_6)-címkével (tag-gel) ellátott változatát *E. coli* BL21 törzsben termeltettük meg. (A pGEX2TK4T1 előállításához a pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) EcoRI-PstI-fragmentjét klónoztuk a pGEX-2TK (Amersham Biosciences) vektorba.) A tau kódoló szekvenciát a pGEX-4T-1 gyári vektorba szubklónoztuk. A GST-TRESK$_{hurok}$ a GST-TRESK$_{hurok}$-TAP$_{tag}$ és a TRESK$_{hurok}$-His_8 klónozásának és tisztításának részleteit munkacsoportunk korábbi közleményeiben lehet megtalálni [68;90]. Lényegében ezeknek az előállításához is a pGEX és pET vektorok megfelelő változatai kerültek felhasználásra. Ez utóbbi GST-

fúziós fehérjéket natív, a His_8 címkével ellátott fehérjéket pedig inklúziós testekből denaturáló körülmények (7M urea) között tisztítottuk, és glutation vagy Ni-NTA affinitás gyantához (nikkel-nitrilotriecetsav; Qiagen, Chatsworth, CA) kötve tároltuk, illetve alkalmaztuk a kináz reakciók során szubsztrátként.

A tandem (a csatorna mindkét alegysége egy polipedtidláncban helyezkedik el) egér TREK-2 csatornák (wt/wt, wt/mutáns és mutáns/wt) létrehozásához az első alegység TAA stop kodonját, valamint a második alegység ATG start kodonját egy egyedi (felismerési hellyel rendelkező) MunI restrikciós enzim hasítási hely bevitelével helyettesítettük, ami egyúttal két linker (összekötő) aminosavat (Gln, Leu) kódolt a két alegység között.

5.9 A rekombináns MARK2 fehérje előállítása

A GST-t tartalmazó különböző mutáns MARK2 és tau fúziós fehérjéket *E. coli* BL21 törzsében állítottuk elő. A tisztításnál használt ún. „A” oldat összetétele a következő volt: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM β-merkaptoetanol, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 2 mM benzamidin, melyet a baktériumok líziséhez kiegészítettünk 5 mM CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) detergenssel. Ebben az „A” oldatban szonikáltuk a baktériumokat. Az affinitás tisztítás során a GST fúziós fehérjéket glutation-agarózon (Sigma) kötöttük meg. A glutation-agarózon immobilizált GST-tau fehérjét „A” oldattal alkotott 50%-os szuszpenziójában 4 °C-on tároltuk. A GST-MARK2 konstrukciókat 20 mM redukált glutationnal kiegészített „A” oldattal eluáltuk az agarózról. A tioredoxin-His ($Trx\text{-}His_6$) címkét tartalmazó fúziós fehérjéket termelő baktériumokat 15 mM imidazollal és 5 mM CHAPS-szel kiegészített „A” oldatban lizáltuk. A fehérjék affinitás tisztítása Ni-NTA agarózon történt. Majd a gyantát kétszer mostuk „A” oldattal, ezt követően még háromszor 60 mM imidazollal kiegészített „A” oldattal. Az eluálást 300 mM imidazollal kiegészített „A” oldatban végeztük. A GST- és a $Trx\text{-}His_6$-taggel jelölt MARK2 fehérjéket 50% glicerint tartalmazó „A” oldattal szemben dializáltuk, és -20 °C-on tároltuk.

5.10 In vitro radioaktív foszforiláció

Az ún. „B” oldat összetétele a következő volt: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM PMSF és 0,5 mM benzamidin. A 10 µl glutation-agaróz gyantán megkötött GST-TRESK$_{hurok}$, GST-TRESK$_{hurok}$-TAP$_{tag}$ és GST-tau rekombináns fehérjéket a szintén rekombináns Trx-His$_6$-MARK2-T208E segítségével foszforiláltattuk 20 µM Na_2ATP-vel, 100 kBq ^{32}P-γ-ATP-vel, 2 mM EGTA-val és 0,5 mM dithiothreitollal (DTT-vel) kiegészített 50 µl „B” oldatban. A konstitutívan aktív T208E mutáns MARK2 használata azért volt előnyös, mert a kináz működéséhez elengedhetetlen az aktivációs hurokban elhelyezkedő 208-as pozíciójú Thr foszforilált állapota, melyet a treonin glutamátra cserélése utánoz. A foszforilációs reakciót 30 °C-on 1 órán át, folyamatos keverés (200 rpm) mellett végeztük. Ezután 12%-os (akrilamid-tartalmú) nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével elválasztottuk a fehérjéket, majd a gélt Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük. A foszforilációs reakció létrejöttét a szubsztrátban megjelenő radioaktivitás jelzi, ami a ^{32}P-γ-ATP-ből beépülő β-sugárzó foszforizotópot (^{32}P) tartalmazó foszfátcsoportból származik. A kvantitatív kiértékelést a GS-525 PhosphorImager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülékkel végeztük. A különböző, Ni-NTA gyantán megkötött TRESK$_{hurok}$-His$_8$ konstrukciókat a GST-MARK2-T208E konstrukciót használva szintén a „B” oldatban foszforiláltattuk, kiegészítve a reakciót β-merkaptoetanollal (1,4 mM-ra), Na_2ATP-vel (20 µM-ra) és 50 vagy 100 kBq ^{32}P-γ-ATP-vel. A termékeket a TRESK$_{hurok}$-His$_8$ kis mérete miatt 15%-os (akrilamid-tartalmú) SDS-PAGE alkalmazásával választottuk szét. A Coomassie Brilliant Blue festéket csak mérsékelten megkötő, erősen hidrofób fehérje fragment rendhagyó módon 19 kDa körül vált láthatóvá a kalkulált 13,5 kDa helyett.

5.11 A ruténiumibolya (RV) tisztítása

A ruténiumibolya tisztítását karboximetil-cellulóz (CM; Whatman CM52) gyantán kationcserélő kromatográfiával Prof. Enyedi Péter végezte. A régi (Aldrich, 1996) ruténiumvörös (RR) preparátumból 70 mg-ot 30 ml 10 mM-os ammónium-acetátban oldottunk fel. Az oldatot 0,4 ml/perc-es átfolyási sebességgel vittük fel az 1

ml-es CM52 oszlopra. Az átfolyó frakció színtelen volt, az oszlop pedig sötétre színeződött az adszorbeált festéktől. Az RR-t kétszeri izokratikus eluálást (10 ml 750 mM ammónium-acetát) követően többszöri mosással (20 ml 50 mM ammónium-acetát) választottuk le az oszlopról, míg az RV-t lineáris grádiens elúcióval (20 ml 50 mM-1,5 M ammónium-acetát) nyertük. A legmagasabb RV csúcs 1,2-1,4 M között jött le az oszlopról. Az így nyert RV frakciókat liofilizáltuk, majd azonnal 10 mM-os ammónium-acetátban oldottuk fel, és -20 °C-ra fagyasztottuk.

A számított RV/RR hányados 0,1-ről 9,5-re emelkedett a tisztítás folyamán. Az RV koncentrációját a következők ismeretében számoltuk: 734 nm-en az RV extinkciós koefficiense ε=311 $(g/100\ ml)^{-1}cm^{-1}$[214], a molekulatömege 751,43 g/mol [230]. A kísérletek során a 10 mM-os RR és RV törzsoldatokat közvetlenül a mérések előtt hígítottuk magas $[K^+]$-jú oldatban a használni kívánt koncentrációra.

5.12 Statisztikai analízis, dózis-hatás görbeillesztés és korrelációanalízis

Az adatokat átlag ± az átlag hibája (standard hiba, S.E.M.) formában tüntettem fel. A különbségek kiértékelését a kísérleti modellnek leginkább megfelelő teszttel végeztük a STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK) programcsomag segítségével, a görbeillesztéshez és korrelációanalízishez az ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) programot használtuk. Az alkalmazott teszteket az adott helyen, az ábráknál feltüntettem. Legtöbb esetben a Student-féle kétmintás t-próbát használtuk, ezenkívül használtunk egyszempontos (one-way) variancia-analízist (ANOVA) Tukey HSD vagy Scheffe post hoc teszttel, valamint a Pearson produkt-momentum korreláció analízist. A normalizált dózis-hatás görbéket a következő, módosított Hill egyenlet alapján illesztettük: $y=\alpha/[1 + (c/K_{1/2})^n] + (1 - \alpha)$, ahol c a koncentráció, $K_{1/2}$ a fél-maximális gátló koncentráció, n a Hill koefficiens, az α pedig a kezelés általi maximális gátlás mértéke. Az elemszámokat a megfelelő helyen és az ábraaláírásban adom meg. A különbségeket $p<0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

6. Eredmények

6.1 A TRESK háttér K^+ csatornát emlős sejtvonalban is aktiválja a kalcineurin

Munkacsoportunk korábban igazolta, hogy a *Xenopus* petesejteken kifejezett TRESK csatorna nagymértékű, 5-10-szeres kalciumfüggő aktivációját a Ca^{2+}/kalmodulin-dependens protein foszfatáz kalcineurin hozza létre. Irodalmi adatok szerint G_q-fehérje-kapcsolt receptorok ingerlését követően emlős sejtvonalban is aktiválódik a TRESK, de az áramfokozódás jellemzően csak 30-82% közötti, tehát nem éri el a kétszeres növekedést sem [78;84]. Kérdéses volt, hogy mi lehet ennek a jelentős különbségnek az oka, valamint az, hogy vajon az emlős sejtekben kifejezett TRESK csatorna szabályozásáért is a kalcineurin, a kalciumjelre aktiválódó foszfatáz felelős-e.

Kísérletünkben ezért egér TRESK csatornával tranziensen transzfektált HEK293 sejtekben vizsgáltuk a csatorna kalciumfüggő szabályozását. Valamennyi mérésben patch clamp eljárást, teljes-sejt (whole-cell) konfigurációt alkalmaztunk. A különböző K_{2P} csatornákat kódoló plazmiddal történt tranziens transzfekciót követően legalább egy nagyságrenddel nagyobb amplitúdójú K^+ áramot (>0,5-1 nA) mértünk az általunk alkalmazott módszerrel, mint a nem, vagy üres plazmiddal transzfektált HEK293 sejteken (50-100 pA endogén K^+ áram).

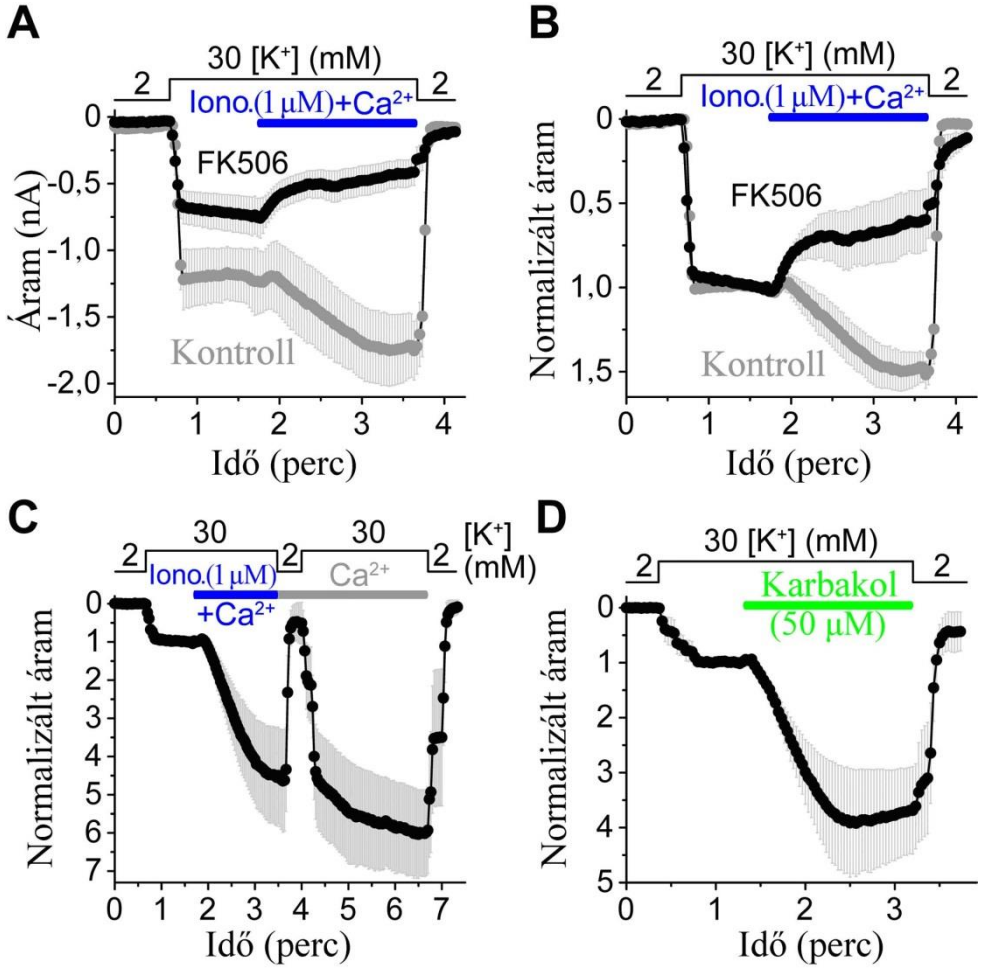
Mivel sejtettük, hogy az emlős sejtekben leírt kisfokú TRESK aktiváció hátterében a csatorna fokozott alapaktivitása állhat, ezért különböző óvintézkedéseket tettünk a csatorna mérés előtt kifejlődő kalciumfüggő aktivációjának elkerülésére.

A kalciumjelet létrehozó stimulus alkalmazása előtt kalciummentes EC- és pipettaoldatot használtunk, amelyek alacsony (50 μM) koncentrációban a Ca^{2+}-kelátor EGTA-t is tartalmazták. Az ingerléskor a kalcium ionofór ionomycin (1 μM) EC oldatban történt alkalmazásakor természetesen kihagytuk az EGTA-t, valamint 2 mM Ca^{2+}-mal is kiegészítettük az extracelluláris oldatot. Az így kiváltott intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció emelkedés hatására a TRESK-áram mérsékelt aktiválódását figyeltük meg (50±12%-os áramnövekedés, 8./A ábra: szürke, kontroll görbék, n=6), ami

nagyságrendileg megfelel a mások által mért eredményeknek. A sejtek (15-40 percig tartó) előkezelése a kalcineurin-inhibitor FK506-tal (1 μM) az ionomycinnel kiváltható aktivációt teljes egészében megakadályozta, sőt kisfokú gátlást mértünk (38±18%, 8./B ábra: fekete, FK506 feliratú görbék, n=6; $p<0,01$ szignifikáns különbség a kontroll csoporttal összehasonlítva). A gátlást feltételezhetően az ionomycin direkt farmakológiai hatásának tulajdoníthatjuk, ahogy ezt munkacsoportunk korábban *Xenopus* petesejteken is megfigyelte [90]. A TRESK aktiváció elmaradása a kalcineurin gátlószerrel történt kezelést követően arra utal, hogy a humán HEK293 sejtekben is az endogén kalcineurin fokozza a csatorna működését.

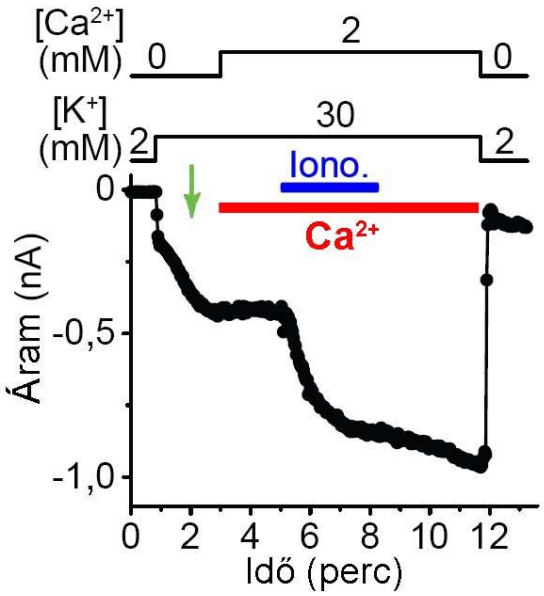
Az FK506-tal előkezelt csoportban (az 8./A ábrán jól látható módon) kisebb átlagú TRESK alapáram adódott, mint a nem kezelt sejtekben, habár a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,09$). Emiatt arra gondoltunk, hogy a kontroll csoportban már az ionomycin-stimuláció előtt is részlegesen aktivált állapotban lehettek a TRESK csatornák. Vagyis felmerült, hogy a kalciummentes, EGTA-t is tartalmazó oldatok ellenére a mérési konfiguráció kialakítása előtt vagy közben olyan stimulus éri a sejteket, ami a TRESK-áram aktivációját eredményezi már a mérés megkezdése előtt. Mivel a HEK293 sejtek számos endogén receptora között a $P2Y_1$ és $P2Y_2$ purinerg G_q-fehérje-kapcsolt receptorok is megtalálhatók [231], melyek többek között extracelluláris ATP-re is aktiválódnak, ezért a továbbiakban a pipettaoldatból kihagytuk az ATP-t és a GTP-t. A gigaseal kialakítása előtt valószínűleg valamennyi ATP kiszivárgott a pipettából, és ingerelte a sejtek purinerg receptorait, mely a sejten belüli raktárakból kalcium-felszabadulást, és így a TRESK csatornák aktivációját okozta. ATP- és GTP-mentes pipettaoldatot alkalmazva, valamint az ionomycin-kezelést követően a sejtekre tovább folyatva a kalciumtartalmú, de már ionomycinmentes EC oldatot (az ionofór direkt gátló hatását megszüntetendő) a TRESK-áram növekedése 6,0±1,1-szeresnek (n=5, 8./C ábra) adódott. Ez már jól megközelíti a *Xenopus* petesejtben mért aktiváció mértékét [68].

Tehát a TRESK jelentős aktivációját az EC [Ca^{2+}] megemelésével és az egyidejű Ca^{2+} ionofór ionomycin alkalmazásával értük el. Mint minden kettős ingerlés esetén, itt is felmerül a kérdés, hogy a kétféle ingerlésnek külön-külön mekkora szerepe volt a detektált válasz kialakításában.



8. ábra: Az egér TRESK áram aktivációja HEK293 sejtekben.
Teljes-sejt patch clamp konfigurációban, a -100 mV-os feszültséglépések végén jelentkező K^+ áramokat mértük az egér TRESK csatornával tranziensen transzfektált HEK293 sejteken. Az EC oldat $[K^+]$-t 2 és 30 mM között változtattuk a görbék felett jelzett módon. Az A-C paneleken a TRESK aktivációt 1 μM ionomycinnel és 2 mM Ca^{2+}-mal kiegészített 30 mM-os $[K^+]$-jú oldatban váltottuk ki (*Iono.+Ca*$^{2+}$ feliratú vastag kék vonal). Az átlaggörbék alatt, ill. felett látható szürke sávok hossza a standard hiba értékeinek felel meg minden ábrán. (**A**) A TRESK áram kalciumfüggő aktivációja kontroll (szürke görbe, n=6) és a kalcineurin-inhibitor FK506-tal előkezelt (1 μM, 15-40 perc, fekete görbe, n=6) sejteken. A kalciummentes EC- és pipettaoldat 50 μM EGTA-t, valamint a pipettaoldat GTP-t (0,1 mM) és ATP-t (1 mM) is tartalmazott. (**B**) Az A panel görbéi, a kezelések előtti TRESK áramra normalizálva. Az értekezésben szereplő valamennyi normalizált aktivációt ennek megfelelően, a kezelés előtti alapáramra vonatkoztatva számoltam, valamint a magas $[K^+]$-jú EC oldatban mért áramot mindig az alacsony $[K^+]$-jú EC oldatban mért kis amplitúdójú, nem specifikus (leak) áram amplitúdóval korrigáltam. (**C**) A TRESK áram ionomycinnel kiváltott kalciumfüggő aktivációja ATP-és GTP-mentes pipettaoldattal, az A panelen leírtakhoz hasonló körülmények között. A 2 perces ionomycin-stimulációt követően Ca^{2+}-mal kiegészített 2 és 30 mM-os $[K^+]$-jú oldatot folyattunk tovább a sejtekre (*Ca*$^{2+}$ feliratú vastag szürke vonal, n=5). (**D**) A C panelen leírtakkal megegyezően, de ionomycin helyett 50 μM karbakollal (görbe felett jelölve) kiegészített 30 mM-os $[K^+]$-jú oldattal stimuláltuk a TRESK áramot, kihasználva a HEK sejtek endogén M3 muszkarinerg receptorait (n=5). (Az I. saját közlemény anyagából módosítva.)

Vizsgálataink korábbi fázisában a TRESK csatornával transzfektált HEK293 sejtek háttér K^+ áramát megvizsgáltuk úgy is, hogy először a $[Ca^{2+}]$-t emeltük, és csak ezt követően adtuk az ionomycint. A sejtek egy részében a TRESK áram már a $[Ca^{2+}]$ növelésekor aktiválódni kezdett (a regisztrátumokat nem mutatom). Fontos azonban leszögezni, hogy a sejtek egy másik hányadában az aktiváció csak az ionomycin adásakor kezdődött el (9. ábra). Az FK506-tal nyert farmakológiai eredmények mellett ez is arra utal, hogy a TRESK aktivációt nem a Ca^{2+} közvetlen csatornára kifejtett hatása hozta létre, hanem a kalciumnak a sejtbe kellett jutnia, hogy a kalcineurint aktiválhassa. Mivel a sejtek válasza jelentős variabilitást mutatott az ingerlés két lépése tekintetében, ezért döntöttünk úgy, hogy a $[Ca^{2+}]$ emelését és az ionomycint egyidejűleg alkalmazzuk. A 9. ábrán bemutatott reprezentatív regisztrátumon az is megfigyelhető, hogy a mérés kezdetekor a háttér K^+ áram amplitúdó alacsony, azonban ezt követően jelentősen növekedett a Ca^{2+}-mentes EC oldatban (*zöld* nyíllal jelölve), mígnem végül stabilizálódott. Ennek a kezdeti aktivációnak a mértéke korántsem volt elhanyagolható

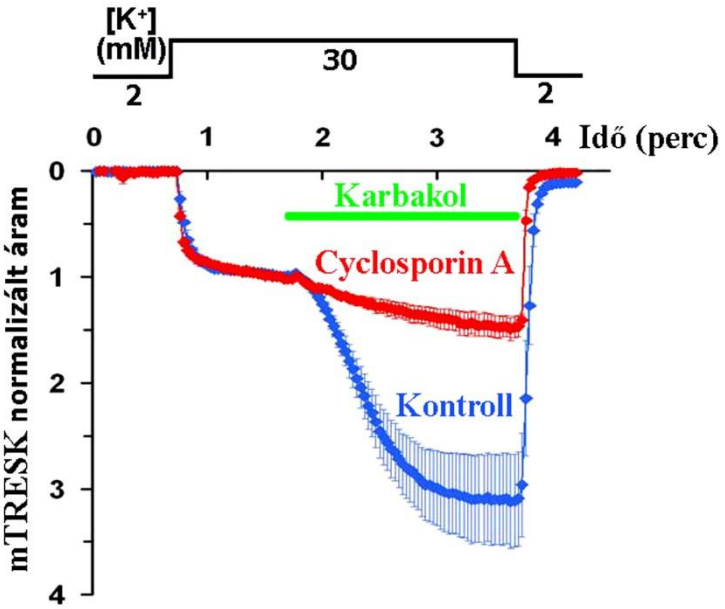


9. ábra: A TRESK csatorna aktivációja HEK293 sejtben rekalcinálást követő ionomycin hatására (*reprezentatív regisztrátum*).
Az egér TRESK csatornával tranziensen transzfektált HEK293 sejt mérését (a membrántapadás (seal) kialakítását is beleértve) kalciummentes oldatban kezdtük. A K^+ áram stabilizálódását követően megnöveltük az EC $[Ca^{2+}]$-t (*vastag piros vonal* a görbe felett), és az ionomycint csak ezt követően alkalmaztuk (*Iono., kék vonal*). Ennél a sejtnél a $[Ca^{2+}]$ növelésére az áram nem változott (*piros vízszintes vonal bal oldali vége jelzi a* Ca^{2+}-kiegészítés kezdetét), csak az ionomycin adásakor. A mérés kezdetén az EC $[K^+]$ 2-ről 30 mM-ra emelésekor az oldatcserélő rendszer gyors kinetikája alapján várt, az adott időskálán közel pillanatszerű áramnövekedést érdekes módon egy lassú áramnövekedési periódus is követte (*zöld nyíl*). (Módosítva az I. saját közlemény kiegészítő anyagából.)

az ionomycinnel létrehozott növekedéshez képest. Ez a kezdeti TRESK áramaktiváció a Ca^{2+}-mentes közegben szintén azt sugallta, hogy a kísérleti elrendezésünkben a csatorna már a mérés kezdete előtt aktiválódni kezdett, és a mérés elején ennek az aktivációs fázisnak a végét regisztráltuk. Feltételezve, hogy a TRESK áramot ezúttal is a kalcium aktiválta, és tekintetbe véve, hogy az EC tér (ekkor még) nem tartalmazta ezt az iont, logikusan adódott a következtetés, miszerint a Ca^{2+} ilyenkor az intracelluláris raktárból szabadult fel. A mérés kezdete előtti TRESK aktiváció okaként ezek a kísérletek hozták gyanúba az ATP-t mint G_q-kapcsolt receptor agonistát.

A TRESK-et expresszáló HEK293 sejteket karbakol (50 μM) kolinerg agonistával ingerelve a sejtek endogén muszkarinerg M3-as receptorain keresztül [232] is ki tudtunk váltani kalciumjelet és TRESK áram aktivációt, mely 3,9±0,9-szeresnek (n=5, 8./D ábra) adódott kalciummentes pipetta- és EC oldatot használva. (A pipettaoldat ebben a kísérletben is ATP- és GTP-mentes volt.) Így tehát a receptor stimulációval belső raktárakból létrehozott kalcium-felszabadulás is képes a TRESK áram jelentős növekedését kiváltani, akár kalciummentes extracelluláris környezetben is.

Ebben a kísérleti elrendezésben vizsgáltuk meg egy másik specifikus kalcineurin inhibitor, a ciklosporin A hatását a TRESK aktivációra (10. ábra). Csakúgy, mint az ionomycinnel történő ingerlésnél az FK506-tal (8./B ábra), a receptor ingerlésnél a ciklosporinnal is jelentősen gátlódott a TRESK aktiváció (10. ábra). Ezek az eredmények az FK506-tal végzett kísérletektől függetlenül megerősítik, hogy az aktiváció emlős sejtben is a kalcineurin közreműködésével valósul meg. Eredményeink összességében tehát igazolják, hogy a TRESK jelentős kalcineurinfüggő aktivációja nem kizárólag a *Xenopus* expressziós rendszerre jellemző, hanem megfelelő mérési feltételek között általánosan – emlős sejtekben is – megnyilvánuló szabályozás.



10. ábra: A ciklosporin A kivédi HEK293 sejteken a karbakollal endogén receptoron keresztül kalciummentes közegben létrehozott TRESK aktivációt.
Egér TRESK csatornát kifejező HEK293 sejteken teljes-sejt patch clamp méréseket végeztünk kalciummentes extracelluláris és pipettaoldattal. A -100 mV-on magas EC [K^+]-ban mért (ld. a koordináta rendszer felett jelölve) háttér K^+ áramot a sejt endogén receptorain keresztül a karbakol (50 μM, *zölddel* jelölve) átlagban több mint háromszorosára fokozta (*Kontroll*, *kék görbe*, n=10). A ciklosporin A (1 μM) az aktivációt szignifikánsan csökkentette (*Cyclosporin A*, *piros görbe*, n=5, $p<0,05$). (Nem publikált saját eredmény.)

6.2 A MARK2 kináz gátolja a TRESK csatornát

6.2.1 A TRESK csatorna fő szabályozó régióját foszforiláló kináz azonosítását célzó első kísérletek

A kalcium−kalmodulin-függő protein foszfatáz kalcineurin a TRESK csatorna intracelluláris hurokrégió bizonyos foszfoszerin motívumait, az egér TRESK-ben a Ser^{276} clustert és a Ser 264-es oldalláncot defoszforilálja, ezáltal aktiválja a csatornát. Ezért léteznie kell egy vagy több olyan kináznak, mely ezeket a szerineket foszforilálva a TRESK aktivált állapotát megszünteti, és az áramot visszaállítja a stimulációt megelőző, kiindulási értékre. Korábbi méréseinkben megfigyeltük, hogy hosszú idővel az ionomycin vagy G_q-kapcsolt receptor ingerlést követően, a TRESK áram visszatér a nyugalmi szintre. Ez alapján feltételezhető, hogy a (re)foszforilációért felelős kináz(ok) a petesejtekben is megtalálható(k), azonban hatásuk lassabban érvényesül, mint az aktiváló kalcineuriné. Munkám kezdete előtt munkacsoportunk azt is kimutatta, hogy a 14-3-3 adapterfehérje overexpressziója késlelteti az aktivált áram kiindulási szintre való visszatérését. Ez a hatás azonban függetlennek bizonyult a 14-3-3 közvetlen kötődésétől az egér TRESK csatornához, melynek foszforilált állapotú Ser 264-es oldallánca képes az adapterfehérje megkötésére [90]. Arra is fény derült munkacsoportunk kísérletei során, hogy a Ser^{276} clustert és a magányos 264-es szerint két különböző kináz foszforilálja. A Ser 264-et a PKA képes foszforilálni, a PKA viszont nem befolyásolja a Ser^{276} clustert [85].

Ezért következő célunk a Ser^{276} clustert foszforiláló, a korábbi mutációs vizsgálatok szerint a TRESK K^+ áram szabályozásában legfontosabb kináz megkeresése volt. Azonban az egér és egyéb fajok TRESK Ser clustere nem felel meg pontosan egyik ismert Ser/Thr kináz konszenzus felismerési szekvenciájának sem. Ezért több mint 20 különböző Ser/Thr kinázt klónoztunk meg egérből, és vizsgáltuk ezek TRESK csatornára kifejtett hatását (2. táblázat). Néhány kinázt nem klónoztunk, hanem más módon teszteltük: a megvásárolt és igazolt aktivitású protein kináz A (PKA; Sigma) fehérjét mikroinjektáltuk, és a konvencionális és novel protein kináz C (PKC) izoformákat a forbol észter PMA-val aktiváltuk miközben a PKC működését a

petesejtben egyértelműen igazoltuk a kináz receptor-deszenzitizáló hatásának kimutatásával.

Az ioncsatornákat ismert módon gyakorta szabályozó PKA-n és PKC-n kívül teszteltük a PKB (Akt) konstitutívan aktív változatait is koexpresszióval, illetve az SK kalcium-aktivált K^+ csatornák szabályozásában oly fontos kazein kináz 2 (CK2) több izoformáját, és az alegységeinek különböző kombinációit (2. táblázat). A CK2-t GST-fúziós fehérje formájában is előállítottuk, működését in vitro tejfehérjék foszforilálásával igazoltuk, majd a preparátumot petesejtekbe mikroinjektálva vizsgáltuk. Miután a valószínű lehetőségek siker nélkül elfogytak, ismert, de más sejtbiológiai működésben jelentős kinázokat klónoztunk, mint például a kazein kináz 1-et (CK1), a MAP kináz kaszkádokhoz tartozó Raf1, MEK1, ERK2, illetve MAPKAP-K2 fehérjéket, a glikogén szintetáz kináz 3β (GSK3β) és a kalcium-kalmodulin-függő kináz II (CamKII) enzimeket, továbbá a TGFRβI és II transzformáló növekedési faktor plazmamembrán receptor Ser/Thr kinázokat. Több kináz konstitutívan aktív változatát is előállítottuk irodalmi adatokra alapozva, hátha a vad típus nem aktív a petesejtben.

A kinázokat *Xenopus* rendszerben vizsgáltuk, vajon befolyásolják-e az egér TRESK csatorna működését. A vizsgálandó kinázt és az egér TRESK-et együtt expresszáló, vagy a kináz fehérjével mikroinjektált petesejteken a TRESK áram ionomycin-stimulációjának végét követő hosszú idő (kísérletenként változó, 7-10 perc) elteltével megmértük, hogy milyen mértékű az aktivált áram visszatérése a kiindulási (aktiváció előtti) szintre. Sok esetben a TRESK-S264A vagy -S264E mutánst használtuk, hogy az S264 szabályozó hatását eliminájuk, és a Ser^{276} cluster foszforilációjáról nyerjünk információt.

A vizsgált kinázok közül egyik sem gyorsította a TRESK áram visszatérését a nyugalmi gátolt állapotba (az eredményeket nem mutatom). Tehát az ioncsatornák szabályozásában ismerten szerepet játszó (PKA, PKC, CK2) kinázok nem szabályozzák a TRESK-et a Ser^{276} cluster foszforilációján keresztül, és ezeken kívül számos más kináz sem (2. táblázat). Ugyan több mint 20 féle kinázt vizsgáltunk, azonban ez az ismert Ser/Thr kinázoknak még mindig kevesebb mint 10 %-át teszi ki. A legfontosabb ioncsatornákat szabályozó kinázokkal kapott negatív eredmények nyilvánvalóvá tették, hogy egy Ser^{276} clustert foszforiláló TRESK-kináz megtalálása vagy az összes Ser/Thr kináz szisztematikus szűrését, vagy célratörőbb hipotézist igényel.

2. táblázat: Az alábbi vad típusú (*vt*) és konstitutívan aktív (*ka*), valamint csonkolt (*tr*; „trunkált”) kinázok egér TRESK áramra kifejtett hatását vizsgáltuk, különös tekintettel az áramaktivációt követő visszaállási periódusra. A kinázok többségét RT-PCR-t követően klónoztuk, illetve irodalmi adatok alapján konstitutívan aktívvá alakítottuk, és in vitro szintetizált cRNS-üket a TRESK cRNS-sel együtt mikroinjektáltuk *Xenopus* petesejtekbe. A két kaCHK1* hatását nem tudtuk egyértelműen megítélni, mivel ezek a kinázok a TRESK aktivációját gátolták. A CK2 α1 vagy CK2 α2 katalitikus alegységek és a CK2 β** regulátoros alegység koexpresszióját is megvizsgáltuk. A szarvasmarha eredetű PKA*** enzimet a Sigma cégtől vásároltuk. A PKA a 264-es szerint foszforilálta, de a Ser^{276} clustert nem. A konvencionális és novel PKC**** izoformákat a PKC-aktivátor PMA forbolészter segítségével vizsgáltuk, ami a petesejteken egyértelmű PKC aktivációt okozott, de a TRESK visszaállását nem befolyásolta. (Az I. közlemény kiegészítő anyagából módosítva.)

	Kináz konstrukció	Teljes név	Típus
1	AMPKα1	AMP-aktivált protein kináz (α1 alegység)	vt
	AMPKα1-T183D		ka
	AMPKα1(1-324AA)		ka
	AMPKα1(1-324AA)-T183D		ka
2	B-Raf1	Szerin/treonin-protein kináz B-raf	vt
	B-Raf1-Δ1-426,R427M		ka
	B-Raf1-Δ1-464,R465M		ka
3	CamKIIβ	Ca^{2+}/kalmodulin-dependens protein kináz IIβ	vt
	CamKIIβ-T287D		ka
4	CASK	Ca^{2+}/kalmodulin-dependens szerin protein kináz	vt
	CASK-Δ1-373,V374M		ka
	CASK-S24D+V26L		ka
5	CDK1	Ciklin-függő kináz 1	vt
	CDK1-T14A,Y182E		ka
6	CHK1(1-352AA)*	„Checkpoint” kináz 1	ka
	CHK1(1-416AA)*		ka
7	CHK2	„Checkpoint” kináz 2	vt
8	CK1 α	Kazein kináz 1 α	vt
9	CK2 α1	Kazein kináz 2 α1	vt
10	CK2 α2	Kazein kináz 2 α2	vt
11	CK2 β**	Kazein kináz 2 β	vt
12	C-Raf1	Raf proto-onkogén szerin/treonin-protein kináz	vt
	C-Raf1-Δ1-319,P320M		ka
13	ERK2	Extracelluláris szignál-regulált kináz 2 (MAPK1)	vt
14	GRK2	G-protein kapcsolt receptor kináz 2	vt
15	GSK3β	Glikogén szintáz kináz 3	vt
	GSK3β-S9A		ka
16	MAPKAPK2-kináz domén-T208E	Mitogén-aktivált protein kináz-aktivált protein kináz 2	ka
17	MEK1-S218,222E	Mitogén-aktivált protein kináz kináz (MAP2K)	ka
18	PKA***	Protein kináz A	vt
19	PKB-Δ1-128	Protein kináz B (deléciós mutáns)	ka
	PKB-Δ1-128 N-terminális Src-mirisztoilációs-szekvenciával		ka
20	PKC (konvencionális)****	Protein kináz C	vt
21	PKCζ	Protein kináz C ζ	vt
	PKCζ-A119E		ka
22	PLK1	"Polo-like" kináz 1	vt
	PLK1-T210D		ka
23	SIK(1-343AA)	"Salt-inducible" kináz	tr
	SIK(1-343AA)-T182E		ka
24	TGFβR I	"Transforming Growth Factor" β receptor I	vt
25	TGFβR II	"Transforming Growth Factor" β receptor II	vt
	TGFβR I-T204D		ka

6.2.2 A *Xenopus* petesejtben koexpresszált MARK2 kináz és TRESK csatorna vizsgálata

Mivel a 14-3-3 adapterfehérje overexpressziója lassította a TRESK áram aktiváció utáni visszaállási sebességét, és ez a hatás függetlennek tűnt a közvetlen TRESK−14-3-3 interakciótól (S264A és S264E mutánsoknál is létrejött), felmerült a lehetőség, hogy a Ser^{276} clustert foszforiláló kinázt a 14-3-3 fehérje gátolja. Szakirodalmi adatokat felhasználva [196-197] – miszerint a 14-3-3 fehérje gátolja a kinázaktivitást – merült fel a lehetőség, hogy a mikrotubulus affinitás reguláló kináz (MARK, mikrotubulus-asszociált-fehérje/mikrotubulus affinitást reguláló kináz) család tagjai potenciális TRESK interakciós partnerek.

Az egér TRESK-et és az egér agyból klónozott MARK2-t *Xenopus* petesejtben együtt expresszálva a stimuláció kezdetétől számolt 10. perc végén majdnem teljes volt az átlagos visszaállás (89±3%, n=9), míg a csak TRESK-et kifejező kontroll csoportban mindössze 36±9% (n=6, $p<10^{-4}$, 11./A és B ábra). Már az ionomycinnel kiváltott aktiváció előtt is volt különbség a két csoport alapárama között: a MARK2-t is kifejező petéken ugyanis szignifikánsan kisebb volt a mérhető háttér K^+ áram (0,34±0,04 μA) a kontroll csoporthoz képest (1,05±0,17 μA, $p<0,01$, 11./A ábra). A két csoportban a stimulációt követő átlagos árammaximum közel azonos értékű volt. Tehát a MARK2 koexpressziója a TRESK-kel nemcsak az aktivációt követően, hanem nyugalmi körülmények között is gátolja a csatornát, és drámaian felgyorsítja az aktivált áram nyugalmi szintre való visszatérését.

Mivel egészen kevés (0,16 ng/petesejt) MARK2 cRNS is elég volt a fenti hatások kiváltásához, nem valószínű, hogy a kináz tetemes túlexpressziója idézte volna elő a különbségeket.

A kísérletet jóval inkább fiziológiásnak tekinthető körülmények között is megismételtük. Az ionomycin helyett G_q-fehérje-kapcsolt receptorstimulációval váltottunk ki kalciumjelet és TRESK aktivációt. Ezt követően vizsgáltuk a MARK2 hatását. A petesejtekben a csatorna és a kináz mellett muszkarinerg M1-es receptorokat is koexpresszáltattunk (tripla koexpresszió), melyeket (extracellulárisan adott) karbakollal (1 μM) stimuláltunk. Hasonló eredményeket kaptunk az ionomycin ingerlés során nyerthez, a MARK2-t is kifejező petékben a TRESK-áram visszaállása jóval

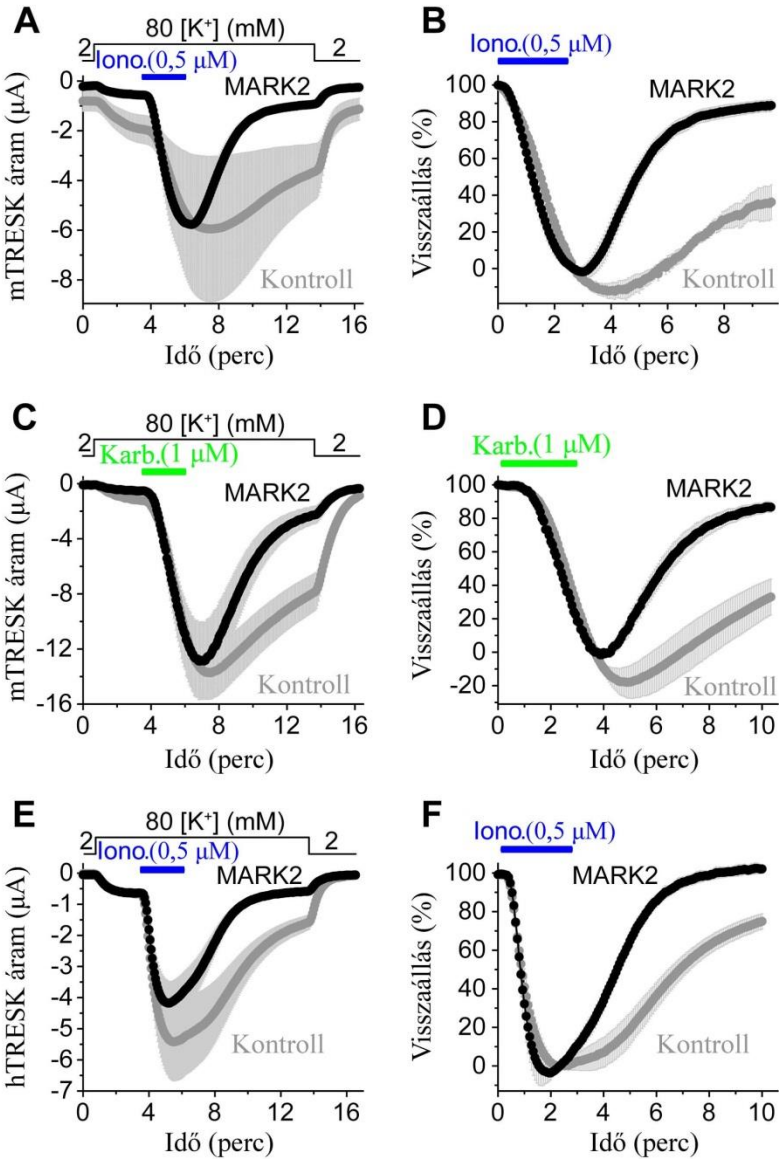
gyorsabb volt (87±3%, n=10, 11./C és D ábra, *MARK2 fekete* görbe), mint a kontroll csoportban (33±11%, n=13, *Kontroll szürke* görbe, p<0,001).

Tehát a MARK2 az élettani viszonyokat jobban megközelítő receptor ingerlés esetén is hatásos volt. Továbbá érdemes megemlíteni, hogy a MARK2 kinázt is kifejező csoportban a TRESK áram fokozódása 30,0±4,9-szeresnek adódott (11./C ábra, *fekete* görbe), ami azt mutatja, hogy bizonyos körülmények között igen jelentős mértékű receptor-mediált aktiváció jellemezheti a TRESK háttér K^+ csatornát.

Mivel a Ser clustert magában foglaló elsődleges szabályozó régió az egér és a humán TRESK ortológokban két aminosavban is eltér: RLS***C***SI***L***SNLD az egér, és RLS***Y***SI***I***SNLD a humán TRESK-ben, így megvizsgáltuk, hogy vajon a humán TRESK áramot is ugyanúgy befolyásolja-e a MARK2, mint az egér ortológot.

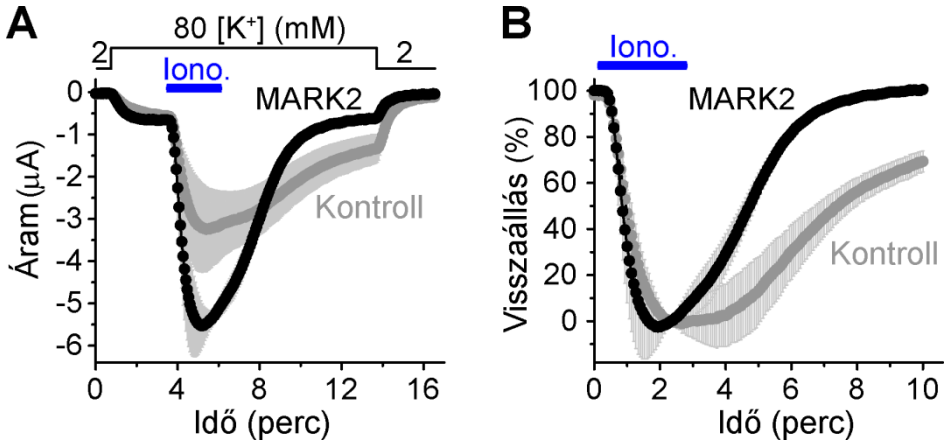
A 11. ábra E és F panelján összefoglalt eredmények azt mutatják, hogy a humán TRESK csatorna aktivációjának lecsengését is jelentősen felgyorsítja a MARK2. Habár a kináz nélküli csoportban nagyobb fokú a visszaállás az egér TRESK csatornához képest (75±4%, n=7 szemben a 33±11%-kal, n=13), a MARK2-vel együtt expresszált humán TRESK áram az aktivációt követően teljes mértékben visszatér a kiindulási értékre (102±2%, n=7), és szignifikáns eltérést (p<0,001) mutat a kinázt nem expresszáló csoporttól. Tehát a humán és egér Ser cluster első két szerinje között található Tyr/Cys, ill. a kevésbé jelentős Ile/Leu különbség nem befolyásolja jelentősen a MARK2 kináz és a TRESK csatorna interakcióját.

A humán TRESK csatornával végzett vizsgálatoknál a MARK2-t is expresszáló csoportban az ionomycinnel történő ingerlést követően alacsonyabb volt a maximális áram, mint a kontroll csoportban (11./E ábra). Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy az eltérő visszaállási kinetika egyszerűen a különböző áramamplitúdók következménye, összehasonlítottuk a kontroll csoport négy legkisebb és a MARK2 csoport négy legnagyobb aktivált árammal rendelkező sejtjén is a visszaállás kinetikáját (12. ábra). Ennél az összehasonlításnál tehát a MARK2-t is expresszáló csoportban nagyobb volt az átlag áramok maximuma, mint a kontroll csoportban, azonban változatlanul az adódott, hogy a MARK2 hatására az áram visszaállása az ionomycin-stimulációt követően gyorsul. Tehát nemcsak az egér, hanem a humán TRESK csatornánál is az áramamplitúdóktól függetlenül növekszik a visszaállási sebesség MARK2 koexpresszió hatására.



11. ábra: *Xenopus* petesejtekben koexpresszált MARK2 hatása a TRESK áram kalciumfüggő aktivációját követő visszaállására.

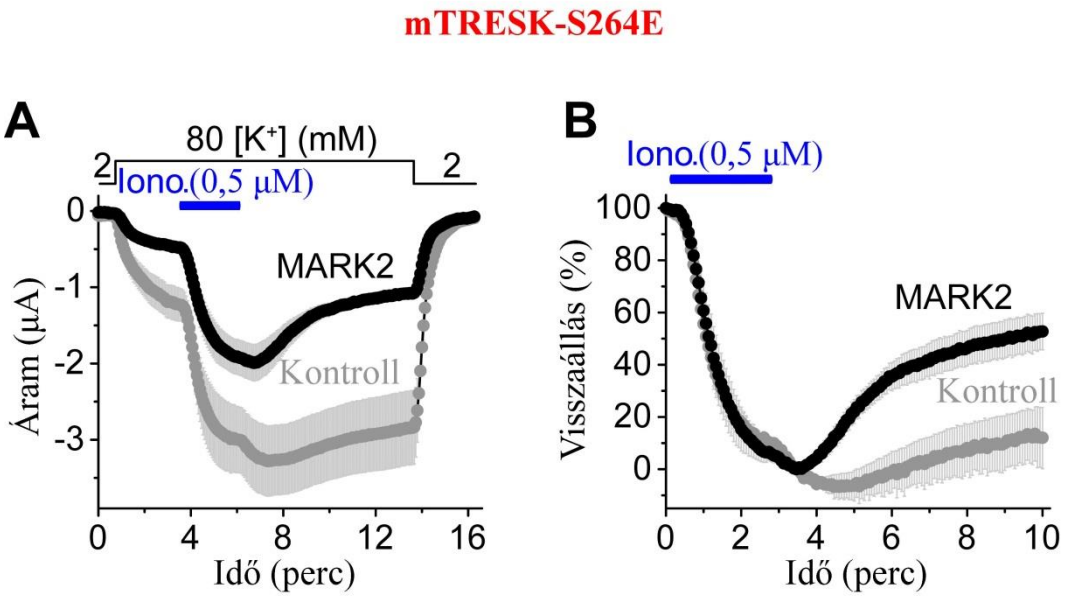
Két-elektródos voltage clamp mérések -100 mV-on kapott értékei egér vagy humán TRESK cRNS-sel injektált petesejteken. Az EC oldat [K^+]-t 2 és 80 mM között változtattuk a görbék felett jelzett módon. Az A, B, E és F paneleken a TRESK aktivációt 0,5 μM ionomycinnel kiegészített 80 mM-os [K^+]-jú oldatban, szintén a görbék felett feltüntetett időszakban (*Iono.* feliratú kék vonal) váltottuk ki. (**A**) Egér TRESK csatornát (kontroll, szürke görbe, n=6), vagy a TRESK mellett MARK2 kinázt is expresszáló (MARK2, fekete görbe, n=9) *Xenopus* petesejtek háttér K^+ árama. (**B**) Az A panel méréseiből származó valamennyi petén kiszámolt %-os visszaállás csoportonkénti átlagai. A visszaállás %-os értékének meghatározása mindig a következők szerint történt: 100% a kezelést közvetlenül megelőző magas [K^+]-jú oldatban mért (alap)áram, míg 0% az ionomycinnel végzett kezelés végén mért aktiválódott (de maximumát esetleg még nem elérő) áram. (**C**) Egér TRESK csatornát és M_1-es acetilkolin receptort (kontroll, szürke görbe, n=13), ill. a TRESK és a receptor mellett MARK2 kinázt is expresszáló (MARK2, fekete görbe, n=10, tripla koexpresszió) *Xenopus* petesejtek háttér K^+ árama, melyet 1 μM karbakollal (görbék felett jelölve) aktiváltunk. (**D**) A C panel eredményei a visszaállás %-ában. (**E**) Az A panelen bemutatott kísérlet egér helyett humán TRESK-kel (kontroll, szürke görbe, n=7; és a MARK2 koexpresszió, fekete görbe, n=7) (**F**) Az E panel eredményei a visszaállás %-ában. ([I]. anyagából módosítva.)



12. ábra: A MARK2-t koexpresszáló sejtek közül a négy legnagyobb és a kontroll, csak humán TRESK-et kifejező sejtek közül a négy legkisebb árammal rendelkező visszaállásának összehasonlítása.
(**A**) A 11. ábra E és F paneleken bemutatott kísérlet sejtjei közül kiválasztottuk a MARK2 csoport négy legnagyobb áram-maximummal rendelkező, és a kontroll csoport négy legkisebb áram-maximummal rendelkező görbéjét, és ezek átlagát ábrázoltuk. (**B**) Az A panel áramgörbéiből határoztuk meg a visszaállási kinetikákat. Jól látható, hogy MARK2-t koexpresszáló sejteknél a visszaállás ilyen válogatás esetén is gyorsabb, mint a kontroll csoportban ($p<0,01$ a visszaállás végén). ([I]. kiegészítő anyagából módosítva.)

6.2.3 A MARK2 kináz hatása a S264E mutáns TRESK csatornára

Korábban leírtuk, hogy a TRESK szabályozásában kevésbé meghatározó szerepű magányos Ser-t (egér csatornában Ser 264, humán TRESK-ben Ser 252) a PKA képes refoszforilálni, valamint ez a foszfoszerin teszi lehetővé a 14-3-3 állványfehérje TRESK-hez való kötődését. Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a MARK2 kináz a TRESK működését, ha ezt a szerint glutamátra mutáljuk, ezáltal megakadályozva ezen a ponton a csatorna foszforilációját (ennélfogva a defoszforilációját is), valamint az állványfehérje megkötését is. Ennek megfelelően a S264E mutáns csatorna ionomycinnel kiváltható aktivációja a vad típushoz képest alulmaradt (3,1±0,4-szeres aktiváció szemben a kb. 6-szoroshoz képest) [68]. A S264E mutáns TRESK csatornát és a MARK2 kinázt együttesen kifejező petéken az ionomycinnel történő ingerlést követően 53±7%-os (n=8) volt az áram visszaállása, míg a kináz nélküli, csak a mutáns TRESK csatornát expresszáló csoportban mindössze 12±12% (n=8, $p<0,02$, 13. ábra). Hasonló visszaállás-gyorsulást kaptunk a MARK2-T208E konstitutívan aktív mutáns kináz (ld. alább) és az S264E mutáns TRESK együttes expressziójával is (nem mutatom az adatokat). Összességében tehát a MARK2 kináz nagymértékben képes felgyorsítani a



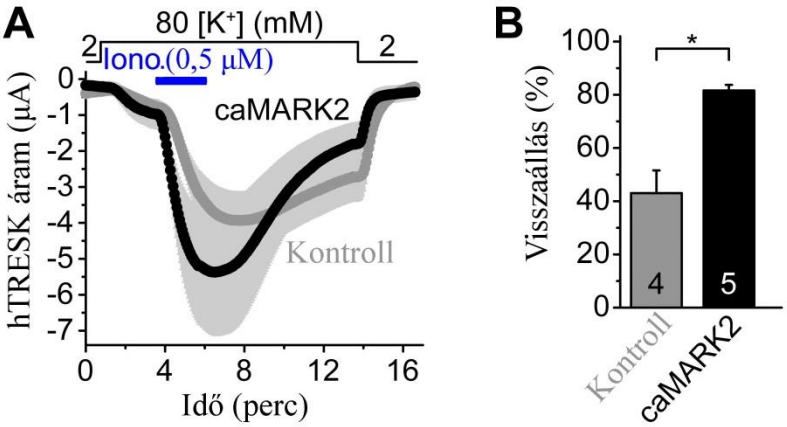
13. ábra: *Xenopus* petesejtekben koexpresszált MARK2 hatása az S264E mutáns TRESK csatorna áramának kalciumfüggő aktivációját követő visszaállására.
(**A**) S264E mutáns egér TRESK csatornát (*Kontroll, szürke* görbe, n=8), vagy a mutáns TRESK mellett MARK2 kinázt is expresszáló (*MARK2, fekete* görbe, n=8) *Xenopus* petesejtek ionomycinnel stimulált háttér K^+-árama. (**B**) Az A panel eredményei a visszaállás %-ában. A kísérlet kivitelezése és az adatok ábrázolása hasonlóan történt a 11. ábrán ismertetetthez. ([I]. anyagából módosítva.)

TRESK áram aktivációt követő visszatérését a nyugalmi állapotba a S264E mutáns csatornán is. Ebből arra következtethetünk, hogy a Ser 264, továbbá a 14-3-3 adapterfehérje ezen keresztül létrejövő közvetlen kölcsönhatása a TRESK csatornával nem szükséges a MARK2 kináz csatornára kifejtett hatásához. Ha a MARK2 hatása nem a Ser 264-en keresztül érvényesül, akkor más támadásponttal kell hatnia, vagyis már ezek az eredmények is azt sugallják, hogy a MARK2 hatása a másik TRESK szabályozási úton, a Ser cluster refoszforilációja révén valósul meg.

6.2.4 A MARK2 által kifejtett TRESK gátlás rövid időn belül létrejön, és nélkülözhetetlen hozzá a kinázaktivitás

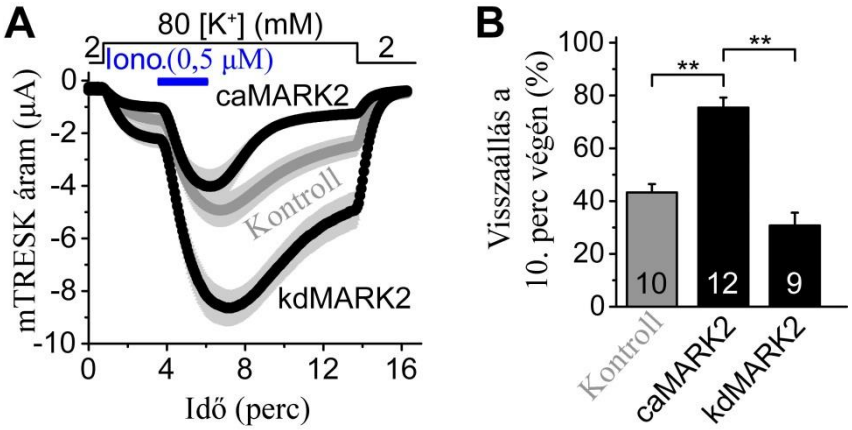
A konstitutívan aktív (constitutively active; *ca*), részben 14-3-3 inszenzitív GST-MARK2-T208E,T539A fúziós fehérjét *E. coli*-ban megtermeltettük, majd a 14-3-3 adapterfehérjét és a humán TRESK csatornát már koexpresszáló petesejtekbe mikroinjektáltuk 144-169 perccel az ionomycin-stimuláció kezdete előtt. Ebben a konstrukcióban a T208E mutáció a kináz aktiváló hurokrégiójában található, és a

beépített glutamát a MARK2 kináz fiziológiás foszforilációs aktivációja során jellemző foszfotreonint utánozva kölcsönöz konstitutív aktivitást az enzimnek. A T539A mutáció pedig a MARK2 egyik (gátló hatású) 14-3-3 kötőhelyét teszi működésképtelenné. A 14-3-3 adapterfehérje koexpressziót a TRESK csatornával a petékben potenciálisan megtalálható endogén TRESK kináz(ok) hatásának mérséklése végett végeztük. A konstitutívan aktív MARK2 fehérjével mikroinjektált sejtekben felgyorsult az inomycinnel létrehozott aktivációt követő visszaállás, szemben a kontroll, hőkezeléssel inaktivált kináz preparátummal injektált csoporthoz képest (14. ábra). Ez arra utal, hogy a MARK2 kináz tartós, napokon keresztüli jelenléte nem szükséges a TRESK gátlás kialakításához, hanem az enzim a mikroinjektálás után nem sokkal, a petesejt citoplazmájában történő szétdiffundálását követően is hatékony. Megvizsgáltuk azt is, hogy szükséges-e a MARK2 kinázaktivitása a gátláshoz, valamint azt, hogy a MARK2 két ismert 14-3-3-kötőhelye befolyásolja-e a TRESK-re kifejtett hatást (pl. azáltal, hogy az endogén TRESK kinázok feltételezett 14-3-3 kötőhelyével verseng a szabad 14-3-3-ért), hiszen az állványfehérje gátló hatást fejt ki a MARK2-re. E célból olyan mutáns



14. ábra: Humán TRESK áramot expresszáló *Xenopus* petesejtekbe mikroinjektált konstitutívan aktív MARK2 fehérje hatása az áram kalciumfüggő aktivációt követő visszaállására.
Két-elektródos voltage clamp méréssel -100 mV-on meghatározott háttér K^+ áram amplitúdók humán TRESK és humán 14-3-3η cRNS-sel injektált petesejteken. (**A**) A vad típusú humán TRESK csatornát és humán 14-3-3η-t koexpresszáló petesejtek háttér K^+ árama, melyekbe az ionomycin-kezelés előtt 144-169 perccel a konstitutívan aktív, részben 14-3-3 inszenzitív GST-MARK2-T208E,T539A fehérjét mikroinjektáltuk (caMARK2, fekete görbe, n=5), vagy e fehérje hőinaktivált változatát alkalmaztuk negatív kontrollként (szürke görbe, n=4). (**B**) Az A panel eredményei a visszaállás %-ában a stimuláció kezdete utáni 10. perc végén. Az aktív MARK2 fehérjével injektált csoportban a visszaállás szignifikánsan gyorsabb (*p<0,002). Az elemszámokat az oszlopokban tüntettem fel. ([I]. anyagából módosítva.)

MARK2 kinázt állítottunk elő, melyben a foszforilációfüggő 14-3-3 kötőhelyeken a foszforilációt és így az adapterfehérje kötődését megakadályozó pontmutációk vannak: MARK2-S400A,T539A. Mindemellett a T208E konstitutívan aktív (*ca*) és a T208A/S212A kináz-inaktív (kinase-dead; *kd*) konstrukciókra is szükségünk volt az enzimaktivitás szükségességének vizsgálatához. A konstitutívan aktív, 14-3-3-ra érzéketlen mutáns MARK2-T208E,S400A,T539A fehérjét koexpresszálva a TRESK csatornával az ionomycin-stimulációt követően felgyorsult az áram visszaállása a kizárólag TRESK-kel injektált kontroll, valamint a TRESK mellett a kdMARK2 kinázt (MARK2-T208A,S212A,S400A,T539A) is kifejező csoportokhoz képest (15. ábra). Mivel a kdMARK2 nem gyorsította fel az aktivált áram visszaállását ellenben a caMARK2-vel, így kijelenthető, hogy a MARK2 kináz TRESK csatornára kifejtett hatásához az enzimaktivitás elengedhetetlen.

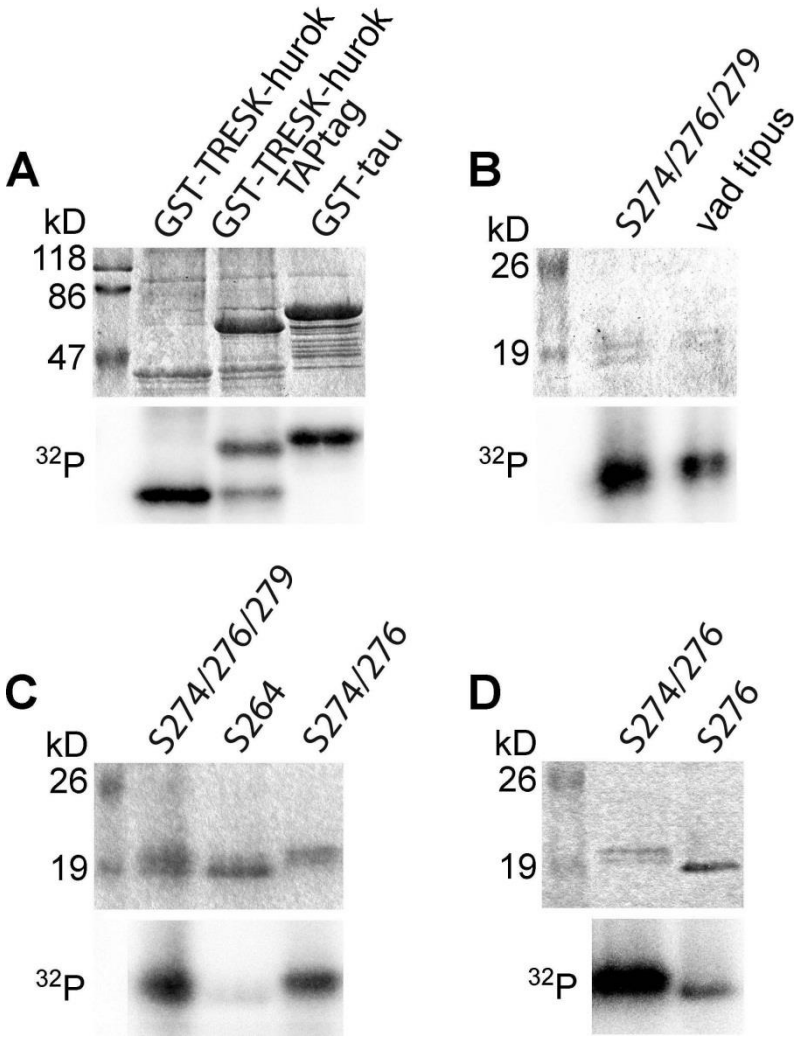


15. ábra: Konstitutívan aktív és kináz-inaktív MARK2 konstrukciók koexpressziójának hatása az egér TRESK áram visszaállására *Xenopus* rendszerben.
(**A**) Csak a vad típusú egér TRESK csatornát expresszáló (Kontroll, szürke görbe, n=10), vagy a TRESK mellett a 14-3-3 inszenzitív, konstitutívan aktív MARK2-T208E,S400A,T539A konstrukciót is kifejező (caMARK2, fekete görbe, n=12), továbbá a TRESK-en kívül a kináz-inaktív MARK2-T208A,S212A,S400A,T539A konstrukciót koexpresszáló (kdMARK2, fekete görbe, n=9) petesejtek háttér K^+ árama. (**B**) Az A panel eredményei a visszaállás %-ában a stimulálás kezdetétől számolt 10. perc végén. A caMARK2 konstrukciót tartalmazó csoportban a visszaállás szignifikánsan gyorsabb mind a kontroll, mind a kináz inaktív csoporthoz képest (**$p<10^{-5}$, Student t-teszt, mely szignifikáns a Bonferroni korrekció alapján a $p<0,05/3$ limit figyelembevételével.) Az oszlopokba írt számok az elemszámokat jelölik. ([I]. anyagából módosítva.)

6.2.5 A TRESK csatorna és a MARK2 kináz kölcsönhatásának vizsgálata in vitro foszforilációs reakcióban

Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon a szabályozásban igen fontos szerineket tartalmazó TRESK intracelluláris hurokrégiót képes-e in vitro foszforilálni a MARK2 kináz. Összehasonlítás végett, ill. pozitív kontrollként egy jól ismert MARK2 szubsztrátot, a mikrotubulus-asszociált proteinek közé tartozó tau fehérjét használtuk GST-fúziós konstrukció formájában mint GST-tau. A GST-tau konstrukció három ismétlődő domént (tubulinkötő doménokat) tartalmaz, mindegyikben a MARK2 kináz reakciókban általánosan használt *KXGS* szubsztrát motívummal. Az egér TRESK 185-292. aminosavát tartalmazó hurok (*loop*) régióját kétféle fúziós fehérjeként állítottuk elő: mint GST-TRESK$_{hurok}$ és mint GST-TRESK$_{hurok}$-TAP$_{tag}$. A szubsztrátfehérje tau és a TRESK-hurok fúziós fehérjéket glutationagaróz gyöngyök felületéhez kötöttük, és a konstitutívan aktív Trx-His$_6$-MARK2-T208E kinázt [^{32}P-γ]ATP jelenlétében adtuk az immobilizált szubsztrát fehérjékhez. A kináz általi sikeres foszforilációt, illetve a megjelenő radioaktivitást Phosphorimager segítségével detektáltuk az SDS-PAGE szeparáció után a gélben megfestett, szubsztrátfehérjének megfelelő molekulatömegnél található csík területén.

A TRESK hurokrégiót tartalmazó szubsztrátok esetén azonos körülmények között hasonló jelerősségű radioaktivitást mértünk, mint a tau fehérjénél (16./A ábra). Tehát a MARK2 kináz hatékonyan képes foszforilálni a TRESK csatorna hurokrégióját a kináz által ismerten foszforilálható tau fehérjéhez hasonlóan. A kísérletet a kölcsönható fehérjéket megjelölő címkék (tag-ek) felcserélésével is megismételtük: a Ni-NTA agarózon immobilizált TRESK$_{hurok}$-His$_8$ és a GST-fúziós fehérjeként előállított konstitutívan aktív kináz, a GST-MARK2-T208E reakciójaként. A vad típusú TRESK$_{hurok}$-His$_8$ csatornarészlet 10 szerint és 1 treonint tartalmaz, beleértve a S264-es és a S274/276/279-es aminosavakat is. Mivel korábbi kísérleteinkben *Xenopus* petesejtekben már bizonyítottuk, hogy a hurokrégió egyéb szerin és treonin aminosavai nem játszanak szerepet a TRESK kalciumfüggő szabályozásában [68], ezért a továbbiakban az említett S264-re és a Ser^{276} clusterre fókuszáltunk az egér TRESK csatorna szabályozásának vizsgálatánál. A vad típusú TRESK-hurok mellett többféle mutáns TRESK-hurok szubsztrátot is megvizsgáltunk.



16. ábra: Az egér TRESK-hurok és a MARK2 in vitro foszforilációs reakciója.
(**A**) A GST-TRESK$_{hurok}$, a GST-TRESK$_{hurok}$-TAP$_{tag}$ és a GST-tau (pozitív kontroll) fúziós fehérjék és a konstitutívan aktív Trx-His$_6$-MARK2-T208E in vitro reakciója ^{32}P-γ-ATP jelenlétében. A panel felső részén a Coomassie Brilliant Blue-val festett SDS-PAGE gél látható, míg alatta ugyanezen gél autoradiogramja. Az egér TRESK 185-292. aminosavát tartalmazó TRESK-hurok fúziós fehérjék hasonló intenzitással jelölődtek foszforizotóppal, mint a pozitív kontroll tau. /A GST-TRESK$_{hurok}$-TAP$_{tag}$ mintájában látható kisebb molekulatömegű (a másik sávban futó GST-TRESK$_{hurok}$-nál alig nagyobb) degradációs vagy nem teljesen transzlált termék szintén foszforilálódott./ (**B**) A GST-MARK2-T208E és a vad típusú TRESK$_{hurok}$-His$_8$ (*vad*), valamint ugyanezen konstrukció mutáns változatának (csak a *S274/276/279* szerineket hagytuk meg, az összes többi szerinjét alaninra mutáltuk) reakciója. (**C**) A B panelen bemutatott reakció más szubsztrátokkal: az egyes mutáns TRESK$_{hurok}$-His$_8$ konstrukciók csak az ábrán feltüntetett szerineket tartalmazták (*S274/276/279, S264* és *S274/276*, a többit alaninra cseréltük). (**D**) Szintén a B panelen bemutatott reakció újabb szubsztrátokkal: az egyik mutáns TRESK$_{hurok}$-His$_8$ konstrukció csak a *S274/276*-os szerineket, míg a másik csak a *S276*-ot tartalmazta (a többi szerint itt is alaninra cseréltük). ([I]. anyagából módosítva.)

Az egyik csak a Ser^{276} cluster három szerinjét tartalmazta, a többi szerint és treonint alaninra cseréltük, egy másik szubsztrátban viszont csak a 264-es pozíciójú szerint hagytuk épen. Ezenkívül olyan további TRESK-hurok mutánsokat állítottunk elő, melyekben az összes szerint és treonint alaninra cseréltük, kivéve a 274-es és a 276-os pozíciójú szerint, egy másik mutánsban csak a 279-es szerint hagytuk meg, míg egy további mutánsban csak a 276-os szerint.

A GST-MARK2-T208E mind a vad, mind a Ser^{276} cluster három szerinjét tartalmazó mutáns TRESK hurokrégiót foszforilálta (16./B ábra), igazolva ezzel, hogy a S274/276/279 cluster a MARK2 kináz közvetlen célpontja. Ezzel szemben a csak S264-et tartalmazó mutáns TRESK-hurkot a MARK2 egyáltalán nem foszforilálta a reakcióban (16./C ábra).

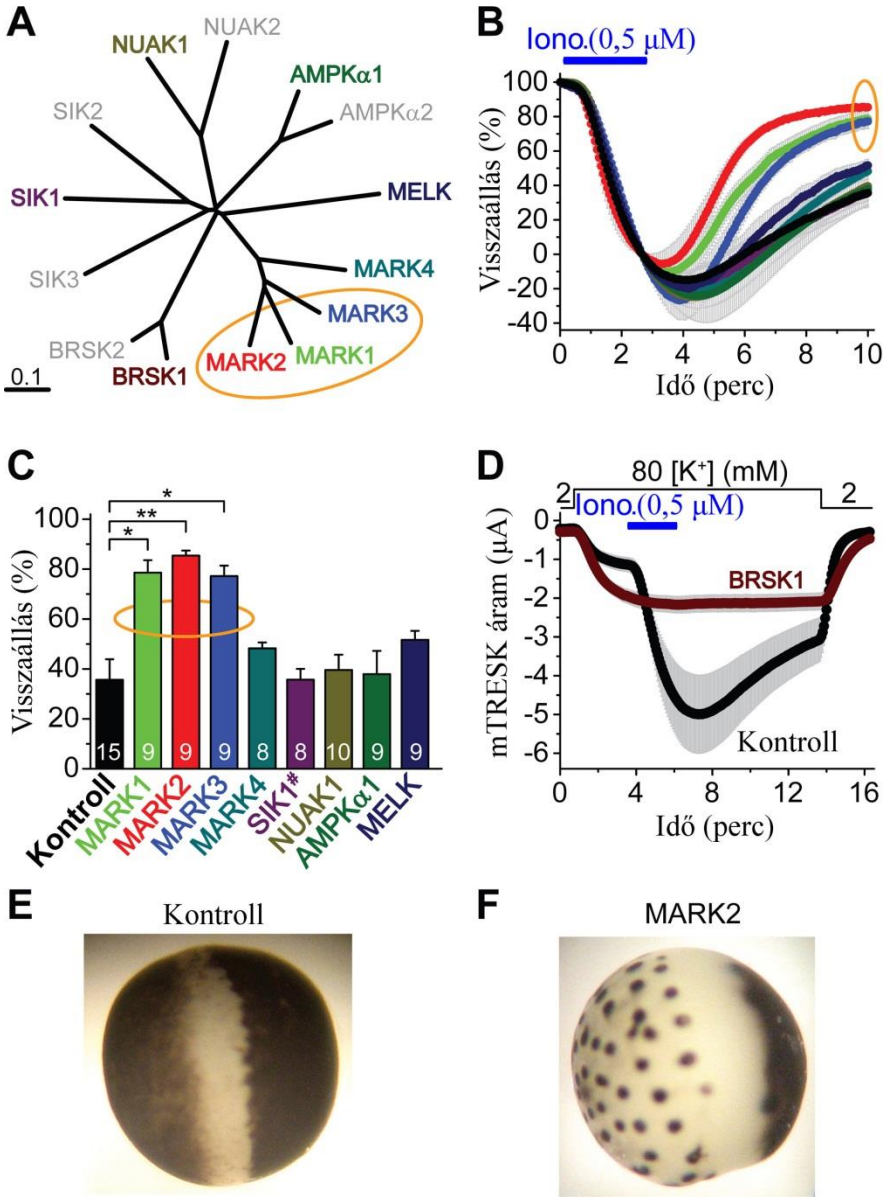
Tehát a MARK2 kináz és a protein kináz A specifitása a TRESK-hurok szabályozásban résztvevő szerinjei iránt komplementer: a MARK2 a Ser^{276} clustert foszforilálja, de a 264-es szerint nem, míg a PKA szubsztrátja a S264, viszont a PKA nem foszforilálja a Ser^{276} clustert [85].

Tovább folytattuk a TRESK Ser^{276} cluster foszforilációjának vizsgálatát, mivel korábbi mérések alapján ismert, hogy e Ser csoporton belül a 276-os szerinnek a pontmutációi változtatják meg leginkább a TRESK áram kalciumfüggő szabályozását *Xenopus* rendszerben: az mTRESK-S276A és az mTRESK-S276C konstitutívan aktív csatornák [68]. A MARK2 foszforilálta a kizárólag 276-os szerint tartalmazó $TRESK_{hurok}$-His_8 konstrukciót (16./D ábra), bár kisebb mértékben, mint a 276-os mellett a 274-es szerint is tartalmazó szubsztrát fehérjét. Ez a gyengébb fokú foszforiláció is utal a 276-os szerin szerepére, mint a kináz egyik szubsztrátjára. In vitro a MARK2 kináz hatására a S274 és a S276 együtt hatékonyan foszforilálódik, függetlenül e két szerin foszforilációjának arányától. A MARK2 nem foszforilálta azt a mutáns TRESK-hurkot, mely csak a Ser cluster 279-es szerinjét tartalmazta (a reakciót nem mutatom). Az in vitro foszforilációs reakció eredményeit összevetve a *Xenopus* petesejteken mért egyértelmű funkcionális adatokkal feltételezzük, hogy élő sejtben is a S274 és a S276 foszforiláció felelős közvetlenül a MARK kinázok TRESK áramra kifejtett hatásáért.

6.2.6 Az AMPK-rokon kináz család tagjainak hatása a TRESK csatornára

Mivel az AMP-aktivált protein kinázzal rokon kinázok (AMPKrK) családjába tartozó MARK2 kináz hatékonyan foszforilálja in vitro a TRESK csatornát, és *Xenopus* rendszerben gátolja a TRESK áramot, ezért a többi AMPKrK közé tartozó alcsalád egy-egy reprezentatív képviselőjét egéragyból megklónoztuk. Ezek a következők voltak (17./A ábra): az AMPKα1, a BRSK1 (más néven ***s****ynapses of* ***a****mphids* ***d****efective*, SAD1, SAD-B), a NUAK1, a MELK kinázok, a SIK1 kináz domént magában foglaló, 1-343. aminosavát tartalmazó konstrukciója, valamint a MARK alcsoport mind a négy tagja (MARK1-4). Az egyes kinázokat vad típusú egér TRESK csatornával *Xenopus* petesejtekben koexpresszálva megvizsgáltuk, hogyan hatnak a TRESK áram ionomycin-stimulációt követő visszaállására.

A szorosabb rokonságot mutató MARK1, MARK2 és MARK3 kinázok mindegyike fokozta a visszaállás sebességét, tehát gátolták a TRESK-áramot (17./B és C ábra). A MARK4, az AMPKα1, a NUAK1, a MELK és a SIK1 (1-343. aminosav) kinázok nem fejtettek ki figyelemre méltó hatást a TRESK áram visszaállására (17./B és C ábra).



17. ábra: Az AMPK rokon kinázok hatása a TRESK csatornára.
(**A**) Az egér AMPK rokon kinázok és filogenetikai fájuk (Clustal W2 és TreeView szoftverek segítségével). Az általunk megklónozott és a TRESK-en kipróbált kinázok színessel vannak jelölve ellentétben a nem vizsgáltakkal (szürkék). A TRESK-et hatékonyan gátló MARK kinázok (MARK1, MARK2, MARK3) narancssárga ellipszisben láthatók. (**B**) Az A panel színkódjaival jelölt egyes AMPK-rokon kinázok koexpressziója esetén az aktivált TRESK áram visszaállása az ionomycin-stimulációt (0,5 μM, görbék felett jelölve) követően *Xenopus* petékben. A MARK1, MARK2, MARK3 csoportok görbéit ismét narancssárga ellipszis mutatja. (**C**) A B panelen bemutatott mérések végén a stimulálás kezdetétől számolt 10. perc végén kapott átlagos visszaállás (%) az egyes csoportokban. Az oszlopokba írt számok az elemszámoknak felelnek meg. A SIK1 konstrukció (SIK1#) csak az 1-343. aminosavat tartalmazta, ami magában foglalja a kináz domént. Az átlagos visszaállás a MARK1, MARK2, MARK3 csoportokban szignifikánsan különbözött a kontroll csoportban mérttől (egyszempontos (one-way) ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt, *p<0,01, **p<0,001). (**D**) TRESK áram és ionomycin-stimuláció a BRSK1 és TRESK koexpressziója (BRSK1, rozsdavörös görbe, n=16), vagy csak a TRESK (Kontroll, fekete görbe, n=15) expressziója esetén. (**E**) Reprezentatív fénykép egy kontroll, csak a TRESK csatornát expresszáló *Xenopus* petesejtről, mely nem különbözik a nem injektált sejtektől, és **(F)** a TRESK mellett a MARK2 kinázt is expresszáló petesejtről. ([I]. anyagából módosítva.)

A BRSK1 teljesen meggátolta az áram aktiválódást, így a visszaállásra kifejtett hatását ezen kísérletben nem tudtuk megítélni (17./D ábra). Ha a BRSK1 expressziót a petébe injektált cRNS-ének csökkentésével mérsékeltük, sikerült kiváltani kisfokú TRESK aktivációt, de a kináz hatása az aktivált áram visszaállására nem volt kifejezett, magasabb cRNS mennyiség esetén enyhén gyorsította (nem mutatom). Emiatt a BRSK1 hatásának megítélése bizonytalan. Valószínűleg a BRSK1 a MARK kinázokhoz hasonlóan gátolja a TRESK csatornát, azonban vélhetően a BRSK1 több ponton is befolyásolja a TRESK szabályozási mechanizmusát, talán az aktivációval is interferál.

Érdekes megfigyelésre tettünk szert, amikor a TRESK csatornát a MARK kinázok valamelyikével vagy a BRSK1 kinázzal koexpresszáltuk: a petékben eddig nem közölt, szembeötlő morfológiai elváltozást találtunk. A sötét animális pólus pigmentált felülete csökkent, míg a világos színű vegetatív féltekén sötét pöttyök jelentek meg, többé-kevésbé hexagonális elrendeződésben (17. ábra, E és F). Az irodalomban nem találtunk ilyen morfológiára utaló leírást, ezért lehetséges, hogy elsőként azonosítottuk.

A jelenség mögötti celluláris és molekuláris mechanizmusok feltárásának lehetőségeink szabtak határt, mindenesetre izgalmas kérdés, hogy a kináz TRESK áramra kifejtett gátlása, vagy egyéb, TRESK-től független kinázhatás felelős ezért a viszonylag lassan kifejlődő, strukturális átrendeződésért.

Mindenesetre a fentebb ismertetett aktív MARK2 fehérje mikroinjektálása során nem alakult ki a jellegzetes morfológiai eltérés (a rendelkezésre álló rövid időn belül), azonban a TRESK-et gátló hatás nyilvánvalóan jelentkezett (14. ábra). Továbbá olyan kis mennyiségű MARK2 cRNS mikroinjektálása is gyorsította a TRESK aktiváció utáni visszaállását (az adatokat nem mutatom), amely még nem okozott pöttyösödést. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az igen komplex, szemmel látható szerkezeti átrendeződés nem szükséges a MARK kinázok által létrehozott TRESK gátlás kifejlődéséhez.

6.3 A ruténiumvörös hatása a K_{2P} csatornák működésére

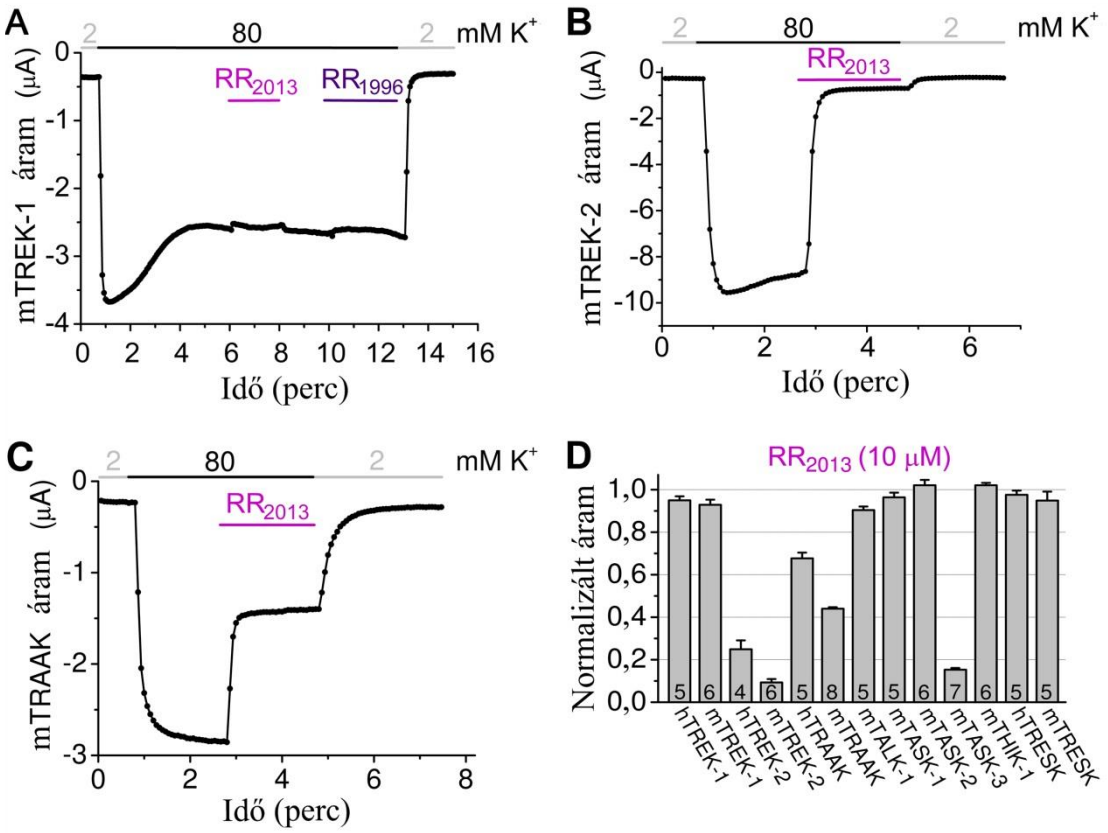
6.3.1 A K_{2P} csatornák ruténiumvörös érzékenységének átfogó vizsgálata

Munkacsoportunknak köszönhetően ismert, hogy bizonyos K_{2P} csatornák igen jól gátolhatók az extracellulárisan alkalmazott polikationos ruténiumvörössel (RR), míg más, sokszor az érzékeny csatornával igen nagyfokú aminosav-homológiát mutató csatornák viszont nem vagy elhanyagolható mértékben reagálnak a festékre (ld. a bevezetésben: 3.2.3., és 3.6.). Az egyes K_{2P} csatornákat *Xenopus* petesejtekben kifejezve két-elektródos voltage clamp technikával -100 mV-on, 80 mM [K^+]-jú EC oldatban mértük meg a 10 μM-os RR háttér K^+ áramokra kifejtett hatását.

Korábbi eredményeinknek megfelelően [52] sem a humán, sem az egér TREK-1 (K_{2P}2.1) áram nem változott jelentősen egyik RR preparátum alkalmazásakor sem (10 μM; 1996-os és 2013-as Sigma RR; 18./A ábra: reprezentatív görbe). Az újabb, 2013-as RR preparátum (RR_{2013}) mindössze 5±1,9%-kal csökkentette a humán TREK-1 (n=5), és 7,1±2,4%-kal az egér TREK-1 (n=6) áramát (18./D ábra).

Meglepő módon azonban a humán és egér TREK-2 (K_{2P}10.1) áram rendkívül érzékenyen és gyorsan reagált a festékre (18./B ábra), annak ellenére, hogy a TREK-1 és TREK-2 aminosav-szekvenciája csak igen kismértékben tér el. Az RR_{2013} a humán TREK-2 áramát 75,1±4,2%-kal (n=4), az egér TREK-2 áramát 90,7±1,6%-kal (n=6) csökkentette (10 μM; 18./D ábra), és hasonló értékeket kaptunk a régebbi RR preparátummal (1996-os Sigma: RR_{1996}) is mindkét fajból származó csatorna esetén. (A továbbiakban többnyire az RR jelölést használom a 2013-as preparátumra, mert a régebbi, kevésbé tiszta 1996-os készítményt csak néhány esetben használtuk, ld. később.)

A TREK alcsalád harmadik tagját, a TRAAK (K_{2P}4.1) áramát szintén gátolta az RR 32,3±2,7%-os (n=5; humán, 18./D ábra), ill. 56,0 ±0,7%-os (n=8; egér, 18./C ábra: reprezentatív görbe) mértékben, de ez jóval mérsékeltebb gátlás, mint amit a TREK-2 esetén tapasztaltunk (18./D ábra), továbbá elmarad a korábban általunk közölt egér TRAAK értékekhez képest is [52]. A látszólagos ellentmondás miatt további vizsgálatok váltak szükségessé a ruténiumvörös TRAAK csatornára kifejtett gátlásának



18. ábra: A ruténiumvörös a TREK-2, a TRAAK és a TASK-3 K_{2P} csatornákat gátolja
Két-elektródos voltage clamp mérések -100 mV-on, egér és humán K_{2P} csatornákat expresszáló *Xenopus* petesejteken. Az összes petesejten történt mérést szobahőmérsékleten (21 °C) végeztük. A [K^+] az EC oldatban a görbék felett feltüntetettnek megfelelően változott. **(A)-(C)** *Reprezentatív mérések áramgörbéi*. **(A)** Az egér TREK-1 csatornát expresszáló petesejten a **TREK-1** áram átmeneti és nem teljes csökkenése („rundown") után adtunk a 80 mM [K^+]-jú EC oldathoz 10 μM RR-t először a 2013-as, majd rövid „mosás" (80 mM [K^+]) után az 1996-os preparátumból (a görbe felett színes vonalakkal jelezve). **(B)-(C)** A 80 mM [K^+]-jú EC oldathoz adott 10 μM RR_{2013} (a görbe felett színes vonallal jelezve) hatása **(B)** az egér **TREK-2**, **(C)** az egér **TRAAK** áramra. **(D)** Különböző K_{2P} csatornák normalizált áramátlaga 10 μM RR_{2013} kezelést követően. Az RR kezelés végén mért áramot a kezelés előtti alapáramra normalizáltuk. Az elemszámokat az oszlopokban tüntettem fel. (A II. saját közlemény anyagából módosítva.)

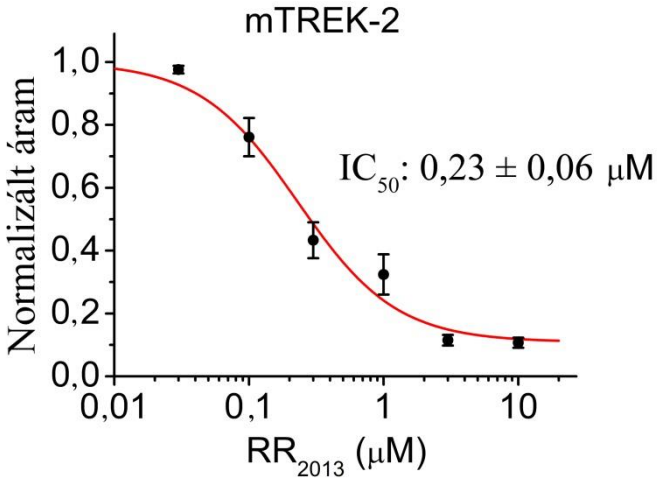
jelenleg és korábban meghatározott eltérő mértékét illetően.

A TASK-3 a korábbiaknak megfelelően [229] rendkívül érzékenyen és nagyfokban gátlódott a festék hatására, míg az egér TALK-1, TASK-1, TASK-2, THIK-1 és TRESK gyakorlatilag rezisztens volt (kevesebb mint 10%-kal csökkentette az RR az áramukat; 18./D ábra).

6.3.2 A TREK-1 és TREK-2 csatornák eltérő ruténiumvörös-érzékenységének magyarázata

Mivel a TREK-2 RR-érzékenységét mi írtuk le először, így szerettük volna részletesebben megismerni a gátlás kvantitatív jellemzőit, illetve mechanizmusát. Ezért első lépésben meghatároztuk az RR_{2013} hat eltérő koncentrációjának felhasználásával a festékre és az egér TREK-2 áramra jellemző dózis-hatás összefüggést, és az így nyert adatokra módosított Hill-egyenlet (ld. Módszerek, Statisztikai analízis alfejezet) segítségével dózis-hatás görbét illesztettünk (19. ábra). Kísérleteink során az egér TREK-2 *c* splice variánsát [233] használtuk, de az egyes splice variánsok szekvenciái az extracelluláris régiókban konzerváltak. Az RR fél-maximális gátló koncentrációja 0,23±0,06 μM az egér TREK-2 áramra vonatkozóan (n=6-9), míg a Hill koefficiens 1,2±0,3, mely alapján feltételezhető, hogy egy RR molekula egy egér TREK-2 csatorna (funkcióképes) dimerével kerül interakcióba.

A gátlás gyors kinetikája (18./B ábra) jó összhangban áll azzal az elképzeléssel, hogy a TREK-2 RR-rel kapcsolatba lépő régiója extracellulárisan helyezkedik el, annak megfelelően, hogy eleve nem is számíthatunk a polikationos nagy festékmolekula membránokon történő átjutására. Ezért a TREK-2 extracelluláris régióin belül az RR



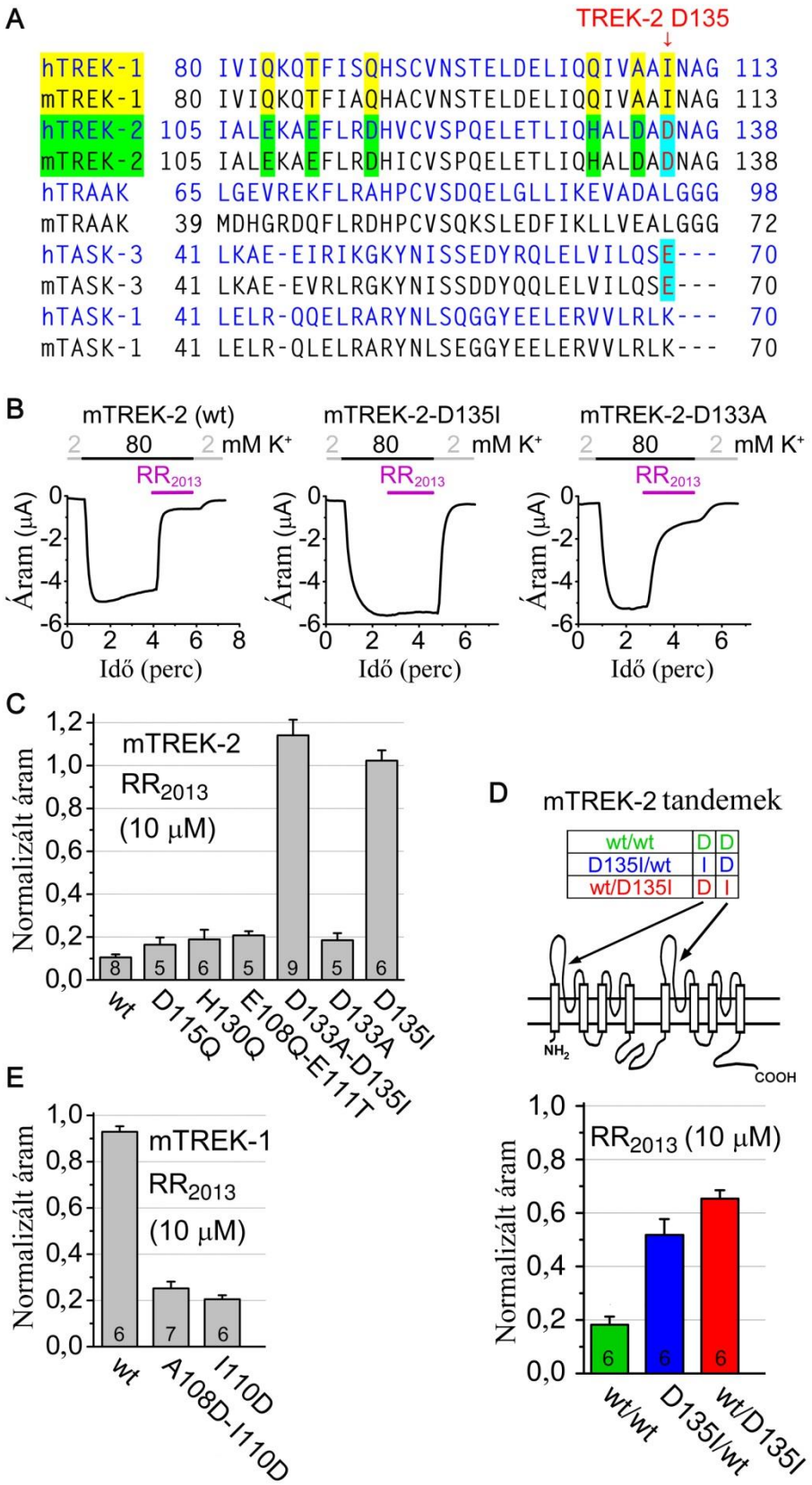
19. ábra: A ruténiumvörös és az egér TREK-2 áram dózis-hatás görbéje
Két-elektródos voltage clamp mérések -100 mV-on, egér TREK-2-t expresszáló *Xenopus* petesejteken, 80 mM [K^+]-jú EC oldathoz adva az RR_{2013}-at 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; és 10,0 μM koncentrációban. Az RR kezelés végén mért áramot a kezelés előtti alapáramra normalizáltuk. Az adatpontok 6-9 petesejten mért normalizált áramok átlagát reprezentálják. A dózis-hatás görbét módosított Hill egyenlet alapján illesztettük az ORIGIN 8.0 szoftver segítségével. ([II]. anyagából módosítva.)

interakció pontos feltérképezéséhez összevetettük az egér TREK-2 és az RR-rezisztens egér TREK-1 aminosav-szekvenciáit (20./A ábra). A többszörösen pozitív töltésű ruténiumvörössel történő interakcióban elsősorban negatív töltésű aminosavak jöhetnek szóba (a már ismert néhány példára is alapozva), valamint a hisztidin deprotonált állapotában, elektronegatív nitrogén atomja miatt. E megfontolásból kiindulva a TREK-2 azon negatív töltésű és hisztidin aminosavait, melyekkel megegyező pozícióban a TREK-1-ben nem negatív töltésű, ill. hisztidintől eltérő aminosavak találhatók, a TREK-1 homológ pozíciójú aminosavaira mutáltuk.

A két K_{2P} csatorna jelentős szekvenciabeli hasonlósága miatt elég volt mindössze két pontmutáns és két dupla mutáns TREK-2 csatorna RR-érzékenységét vizsgálnunk ahhoz, hogy az RR molekuláris célpontját meghatározzuk (20. ábra). A mutációkkal tesztelt aminosav-oldalláncok mindegyike az első extracelluláris hurkon (*cap* domén) helyezkedett el.

A két pontmutáns (mTREK-2-D115Q és mTREK-2-H130Q) és az egyik dupla mutáns (mTREK-2-E108Q-E111T) egér TREK-2 ugyanúgy gátlódott RR-re, mint a vad típusú csatorna árama. Az mTREK-2-D133A-D135I dupla mutánst azonban nem gátolta az RR, ezért előállítottuk a dupla mutánsnak megfelelő két pontmutáns csatornát is, hogy külön-külön megvizsgáljuk a két kérdéses aszpartát (D) szerepét. Az első aszpartát mutációja (mTREK-2-D133A) nem okozott különbséget a gátlás mértékében a vad típusú csatornához képest, szemben az mTREK-2-D135I konstrukcióval, mely rezisztensnek bizonyult ruténiumvörösre (20./C ábra). Tehát az egér TREK-2 *cap* doménján található negatív töltésű aminosav, a 135-ös aszpartát (D135) felel a nagyfokú RR-érzékenységért, mivel az mTREK-2-D135I konstrukcióban az aszpartát semleges töltésű izoleucinra történő mutációja a csatorna festék iránti szenzitivitásának elvesztésével jár.

A továbbiakban tisztázni kívántuk, hogy a dimerként működő csatorna mindkét alegységének aszpartátja (D135) szükséges-e a ruténiumvörös által kifejtett gátláshoz. Ehhez a TASK-1/TASK-3 kísérletekben is használt ún. *tandem (konkatemer)* konstrukciókat készítettünk, melynek lényege, hogy a csatorna két alegységét nem két különálló, hanem egy rövid összekötő (néhány aminosavat tartalmazó) szakaszt is közbeiktatva (*linker*) egyetlen polipeptidlánc alkotja (20./D ábra).



20. ábra: Az első extracelluláris hurok aszpartát aminosava határozza meg a TREK-2 csatorna ruténiumvörös érzékenységét, illetve az eredetileg RR-rezisztens TREK-1 homológ aminosavát aszpartátra mutálva a TREK-1 RR-érzékennyé válik.

(A) Az egér és a humán TREK-1 és -2, TRAAK, illetve TASK-1 és -3 K_{2P} csatornák aminosav-szekvenciája az első EC hurokban (az első TMS és az első P domén között). A TREK-2 azon hisztidinjeit és negatív töltésű aminosavait jelöli zöld szín, melyek helyén a TREK-1 hisztidintől eltérő vagy nem negatív töltésű aminosavat tartalmaz (sárgával kiemelve). A TREK-2 135-ös helyzetű aszpartátja (D135) a TASK-3 70-es glutamátjával (E70) homológ pozíciójú, és mindkét csatornában az RR-érzékenység meghatározója (világoskék háttéren piros betűkkel). **(B)** Reprezentatív görbék az RR TREK-2 áramára gyakorolt hatásáról vad típusú (*wt*), D135I, illetve D133A mutáns csatorna változat esetén. (A mérés és ábrázolás a 18. ábra A-C paneljeihez hasonlóan történt.) **(C)** A vad típusú és különböző mutáns TREK-2 csatornák (a kezelés előtti áramra) normalizált áramátlagai RR_{2013} (10 μM) kezelést követően. A mutánsok előállítása során a zölddel, ill. kékkel kiemelt aminosavakat a homológ pozíciójú (sárgával kiemelt) TREK-1 aminosavakra cseréltük. A vad típusú TREK-2 normalizált áramok átlagához képest csak a D133A-D135I dupla és a D135I pontmutánsok átlagai adtak szignifikáns eltérést (ANOVA, Scheffe-féle post hoc teszt, $p < 10^{-5}$). **(D)** A membrántopológiával is illusztrált különböző *tandem* (*konkatemer:* a csatorna két alegységét nem két különálló, hanem egyetlen hosszú polipeptidlánc formájában tartalmazó) TREK-2 konstrukciók RR-érzékenysége. A D135I mutációt vagy az első (D135I/*wt*, kék), vagy a második alegységnek megfelelő szakaszon (*wt*/D135I, piros) hordozó mutáns tandem csatornák kismértékben gátolhatók ugyan RR-rel, de a vad típusú tandem csatorna (*wt/wt*, zöld) sokkal kifejezettebben gátlódik (p<0,001), hasonló mértékben, mint a nem konkatemer vad típusú TREK-2. **(E)** RR_{2013} (10 μM) hatása a vad típusú (*wt*), az A108D-I110D dupla mutáns és az I110D pontmutáns TREK-1 áramra. RR kezelés előtti áramra normalizált áramátlagok. Az elemszámokat az oszlopokban tüntettem fel. ([II]. anyagából módosítva.)

A kontrollként előállított, mutációt nem tartalmazó, tehát a vad típusú csatornának megfelelő, de *tandem* egér TREK-2 RR-érzékenysége nem tért el a vad típusú mTREK-2 csatornától (20./D ábra; 81,8±3,1%-os gátlás, n=6).

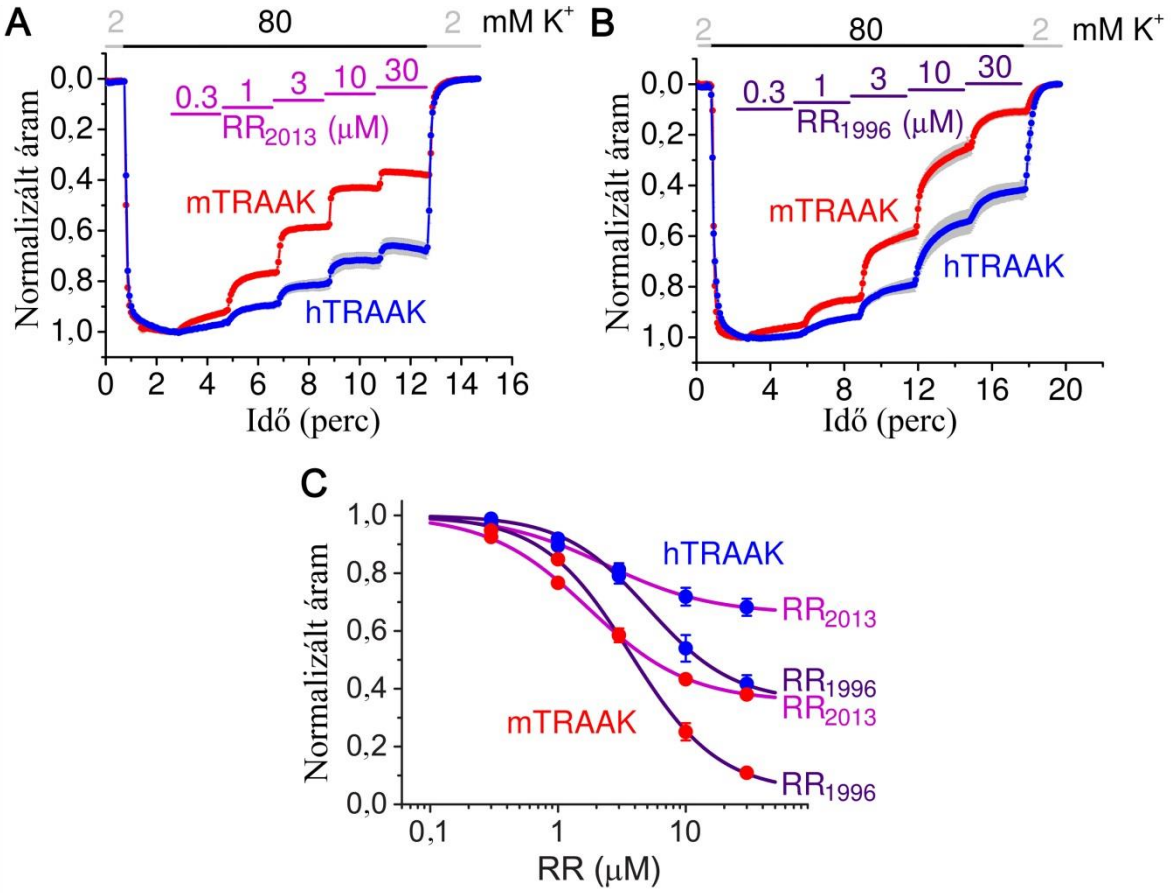
Azon tandem konstrukciókat, melyekben csak az egyik TREK-2 alegység tartalmazza a D135-öt, vagyis a D135I pontmutáció vagy a „C-terminális alegységben” található (*wt/D135I*; 34,7±3,1%-os gátlás (n=6)) vagy az N-terminálisban (*D135I/wt;* 48,2±5,9% (n=6)), a ruténiumvörös kevésbé gátolta, de az érzékenység nem szűnt meg teljesen, ahogy az mTREK-2-D135I esetén, hanem ez utóbbi és a vad típusú csatorna szenzitivitása közé esett (20./D ábra). Tehát az egér TREK-2 mindkét alegységének 135-ös helyzetű aszpartátja szükséges a ruténiumvörös erőteljes hatásához, azonban kisebb mértékben ugyan, de még akkor is képes gátolni az RR, ha csak az egyik alegység tartalmazza a D135-öt.

Az RR-re rezisztens TREK-1 csatornában a fent azonosított 135-ös aszpartátnak megfelelő pozícióban egy hidrofób izoleucin található. Ezt az izoleucint aszpartátra cserélve (mTREK-1-I110D) a mutáns csatorna jelentős mértékben gátolhatóvá vált ruténiumvörössel (20./E ábra; 10 μM RR-re 79,5±1,7%-os gátlás, n=6). Tehát az eredetileg nem érzékeny TREK-1 csatorna egyetlen, megfelelő aminosavát negatív töltésű aszpartátra cserélve RR-szenzitív mutánst kapunk.

6.3.3 A ruténiumibolya hatékonyabb gátlószere a TRAAK csatornának, mint a ruténiumvörös

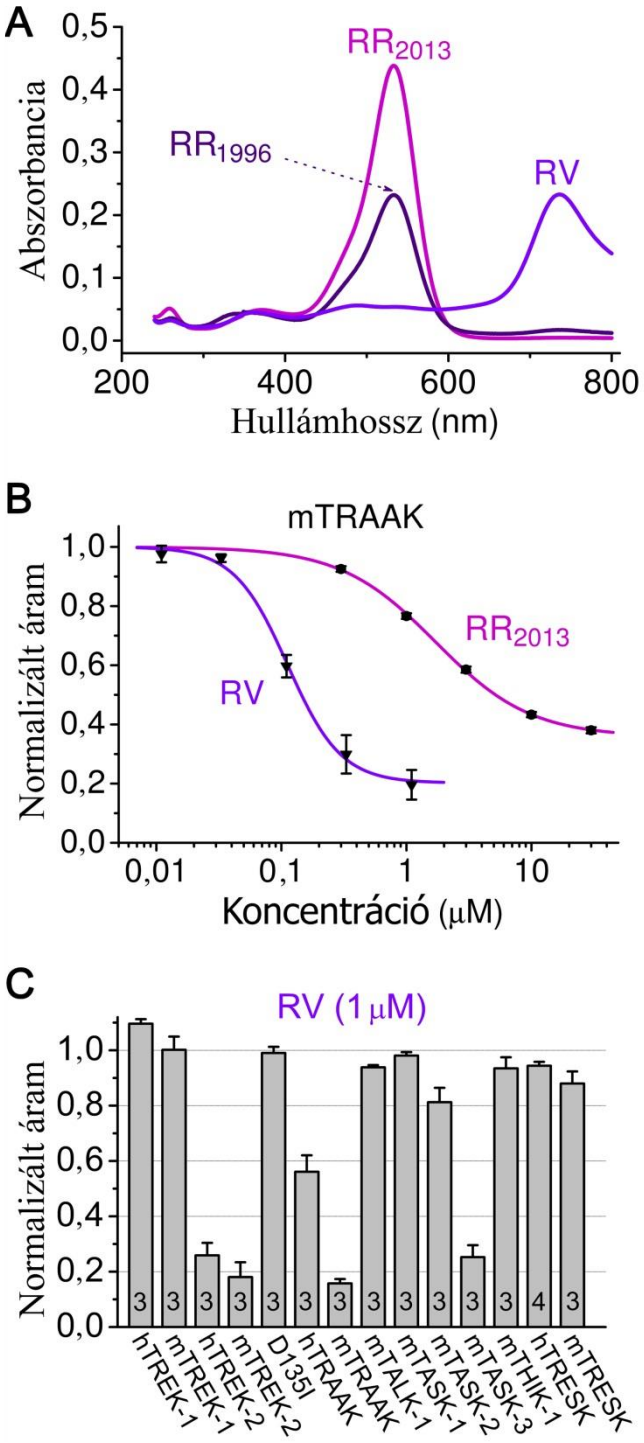
Tisztázni szerettük volna, hogy mi lehet az oka az egér TRAAK áram kisebb fokú RR-érzékenységének (18./C és D ábra) a korábban közölt saját eredményekhez képest [52]. Arra gondoltunk, hogy a különbség egyik lehetséges magyarázata a régebben és jelenleg használt RR preparátumok eltérő összetétele lehet. Ezért összehasonlítottuk a Sigma cégtől vásárolt 1996-os RR preparátumunk (RR_{1996}), és a Ph.D. munkám során is használt, szintén Sigma eredetű 2013-as preparátum (RR_{2013}) TRAAK csatornára kifejtett hatását. Az RR_{1996} az RR_{2013}-nál nagyobb mértékben gátolta mind az egér, mind a humán TRAAK áramot (21. ábra).
Emellett az RR_{1996} által létrehozott gátlás kinetikájában is eltért az RR_{2013}-ra jellemzőtől, ugyanis a potensebb gátlás lassabban alakult ki. Az ábrán az is jól látszik, hogy az egér TRAAK áramot mindkét RR preparátum hatékonyabban gátolta, mint a humán TRAAK áramot. Az RR_{1996} készítmény gátlásának mértéke és kinetikája mindkét fajból származó TRAAK ortológon hasonlóan tért el az RR_{2013} hatásától, tehát az RR_{1996} fajtól függetlenül a TRAAK áramokat erőteljesebben, de lassabb kinetikával gátolja, mint az RR_{2013}.

Régóta ismert, hogy a különböző cégek által kereskedelmi forgalomba hozott eltérő minőségű RR készítmények gyakran nem teljesen tiszták, általában a 200-400 nm közötti abszorpciós maximummal jellemezhető különböző ruténium-amin és nitrozil-ruténium vegyületekkel, valamint a 734 és 900 nm-es abszorpciós csúccsal rendelkező ruténiumibolyával (ruthenium violet, RV) szennyezettek [214]. Az általunk vizsgált RR_{1996} és RR_{2013} oldatának abszorpciós spektruma is eltérő volt (22. ábra). A ruténiumvörösre jellemző 533 nm-es abszorpciós maximum alapján az RR_{1996} preparátum a TRAAK áramra kifejtett nagyobb gátlás ellenére azonos tömegben kevesebb tiszta ruténiumvöröst tartalmazott, mint az RR_{2013}. Más szóval az RR_{2013}-as készítmény nagyobb tisztaságú, vagyis kevesebb szennyeződést tartalmaz, mint a régebbi RR_{1996}. Ebből arra következtettünk, hogy az RR_{1996} eltérő mértékű és kinetikájú gátlásának hátterében a preparátumban megtalálható szennyeződések állhatnak, és ezeket részletesebben vizsgálni kezdtük.



21. ábra: Különböző RR preparátumok hatása a humán (h) és az egér (m) TRAAK áramokra.
(A) Öt különböző, növekvő koncentrációjú RR_{2013} (a Sigma cégtől 2013-ban vásárolt RR) oldat hatása a *Xenopus* petesejteken expresszált humán (kék görbe) és egér TRAAK áramra (piros görbe). A kezelés előtti áramra normalizált, átlagolt áramgörbék. **(B)** Az A panel mérései az RR_{2013} helyett az RR_{1996}-tal, a Sigma cégtől 1996-ban vásárolt RR preparátummal, melyet szintén öt különböző, növekvő koncentrációban alkalmaztunk, de a gátlás lassabb kinetikája miatt nem kettő-kettő, hanem három-három percig. **(C)** Az A és B panelek méréseiből készített dózis-hatás összefüggések az RR_{2013} és RR_{1996} humán és egér TRAAK áramra kifejtett hatásáról. A görbéket módosított Hill egyenlet alapján illesztettük az ORIGIN 8.0 szoftver segítségével. Minden átlagáram görbe, ill. adatpont legalább hat különböző petesejten történt mérés eredménye. ([II]. anyagából módosítva.)

Az RR_{1996} abszorpciós spektrumán egy kis csúcs látható 734 nm körül, mely az RR_{2013} esetén nincs jelen (22./A ábra). A 734 nm-es csúcs a gyakoribb kontamináló vegyületek közül a ruténiumibolyára ($[Ru_3N_2(NH_3)_8(OH)(OH_2)_5]Cl_5$) jellemző [214], ezért szerettük volna megvizsgálni a ruténiumibolya TRAAK csatornára kifejtett hatását.



22. ábra: A ruténiumibolya (RV) potensebb gátlószere a TRAAK áramnak, mint a ruténiumvörös

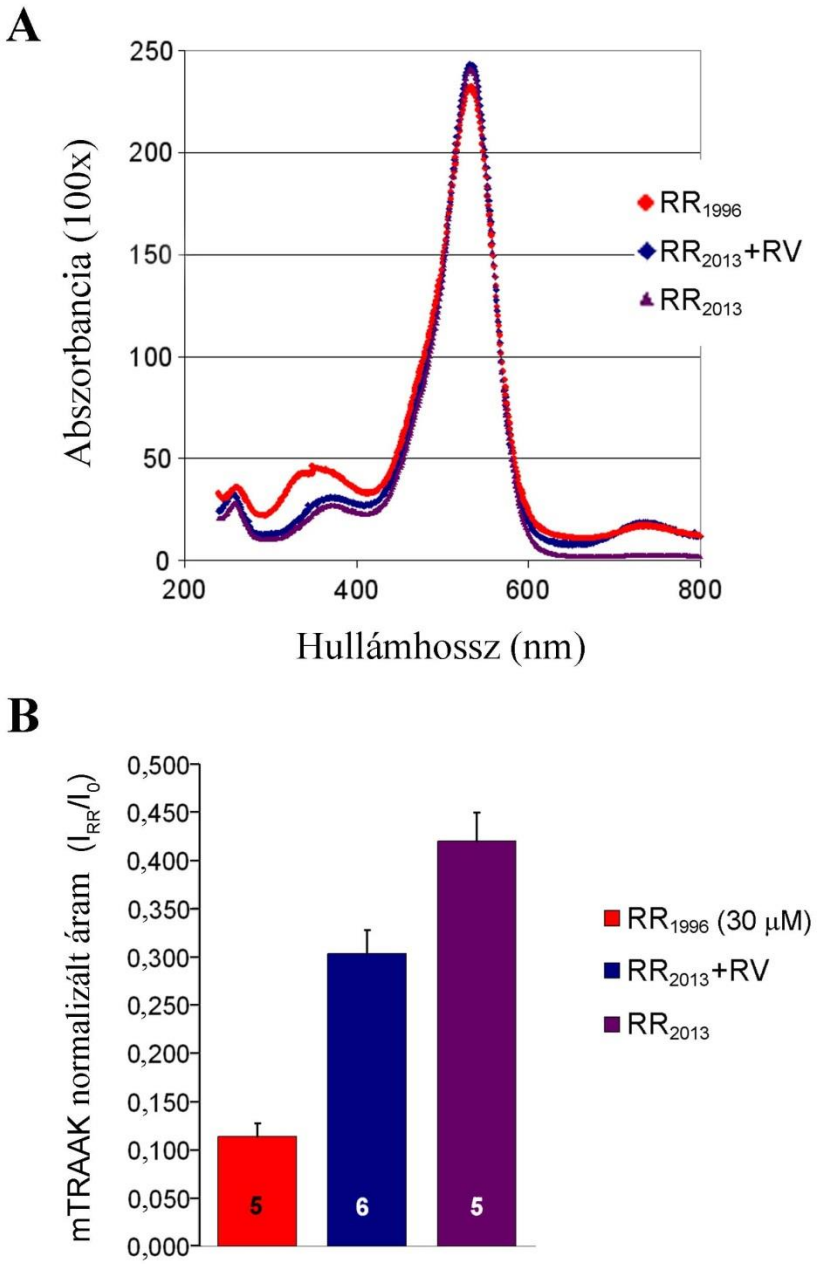
(A) Azonos tömegű RR_{2013}-at, RR_{1996}-at és az általunk izolált RV-t tartalmazó oldatok abszorpciós spektruma, a 240–800 nm hullámhossztartományban. **(B)** Az egér TRAAK áram és az RR_{2013}, ill. az általunk tisztított RV dózis-hatás görbéi. **(C)** A ruténiumibolya (RV; 1 μM) hatása a különböző K_{2P} csatornák áramára. A D135I felirat az egér TREK-2-D135I mutánsra vonatkozik. Az RV kezelés előtti áramra normalizált áramátlagok. ([II]. anyagából módosítva.)

Tiszta ruténiumibolya a kereskedelmi forgalomban nem (volt) elérhető, ezért az RR_{1996} preparátumból karboximetil-cellulóz kationcserélő gyantán történő kromatográfiával megtisztítottuk. A tisztított ruténiumibolya (RV) spektruma a 22./A ábrán látható.

Az RV jobban gátolta a TRAAK áramot, mint az RR, ami az IC_{50} értékek alapján nyilvánvaló: IC_{50}=0,11±0,01 μM az RV, és IC_{50}=1,7±0,1 μM az RR esetén (22./B ábra). A dózis-hatás görbék Hill koefficiense az RR esetén 1,1±0,1-nek, míg az RV esetén 2,0±0,3-nak adódott, ami alapján a két ruténium-vegyület eltérő hatásmechanizmusa feltételezhető. A TRAAK dimer csatorna valószínűleg két ruténiumibolya molekulával képes kölcsönhatásba lépni.

Arra a kérdésre keresve a választ, hogy a kétféle RR preparátum TRAAK áramra kifejtett eltérő hatásának hátterében csak az RR_{1996} (magasabb) RV-tartalma áll-e, a következő kísérletet végeztük. Megpróbáltuk mintegy összeállítani az RR_{1996}-ot az RR_{2013} és az általunk tisztított RV keverékéből úgy, hogy a keverék 533 és 734 nm-en mérhető, az RR és az RV tartalommal korreláló abszorpciós maximuma megegyezzen az RR_{1996} ugyanezen paramétereivel (23./A ábra). Ezt követően összehasonlítottuk a keverék TRAAK csatornára kifejtett gátló hatását az RR_{1996} és RR_{2013} preparátumokéval. E rekonstitúciós kísérlet alapján úgy tűnik, hogy az RV csak részben felelős az RR_{1996} és RR_{2013} eltérő hatásáért (23./B ábra), és az RR_{1996} még egyéb TRAAK-gátló összetevővel is rendelkezik a ruténiumvörösön és -ibolyán kívül. Az azonban kétségtelen az eredményeink alapján, hogy a ruténiumibolya hatékonyabb inhibitora a TRAAK áramnak, mint az RR, és hozzájárulhat ennek a csatornának a gátlásához a különböző ruténiumvörös készítmények szennyezőanyagaként.

Megvizsgáltuk az RV hatását a rendelkezésünkre álló valamennyi K_{2P} csatornára (22./C ábra) is, mely tendenciájában hasonló képet mutatott az RR gátlási profiljához (18./D ábra). Az egér TREK-2 D135I mutánsa RV-re is rezisztens, tehát a TREK-2 esetén nemcsak a ruténiumvörös, hanem valószínűleg a ruténiumibolya is ezen az aszpartáton fejti ki gátló hatását.



23. ábra: A kétféle ruténiumvörös preparátum eltérő hatása a TRAAK csatornára nem csupán az eltérő ruténiumibolya-tartalomnak köszönhető
(A) Összeállítottunk egy RR_{1996}-nak megfelelő keveréket az RR_{2013} és az általunk tisztított RV preparátumokból úgy, hogy a keverék (RR_{2013}+RV) 533 és 734 nm-en mérhető abszorpciós maximuma megegyezzen az RR_{1996} ugyanezen paramétereivel. **(B)** Az A panelen szereplő RR, ill. RR és RV keverékéből összeállított készítmények hatása az egér TRAAK áramra. A kezelés előtti áramra normalizált áramátlagok láthatók az ábrán. Az RR_{2013}+RV keverék erősebben gátolt, mint a tiszta RR_{2013}, azonban gátló hatása elmaradt az RR_{1996} hatásától. Az adott kísérleti körülmények között a két RR preparátum hatása közötti különbségnek az RV körülbelül a harmadáért volt felelős. Az elemszámokat az oszlopokban tüntettem fel. ([II]. kiegészítő anyagából módosítva.)

6.3.4 Ruténiumvörösre érzékeny háttér K^+ áram a hátsó gyöki ganglion idegsejtekben

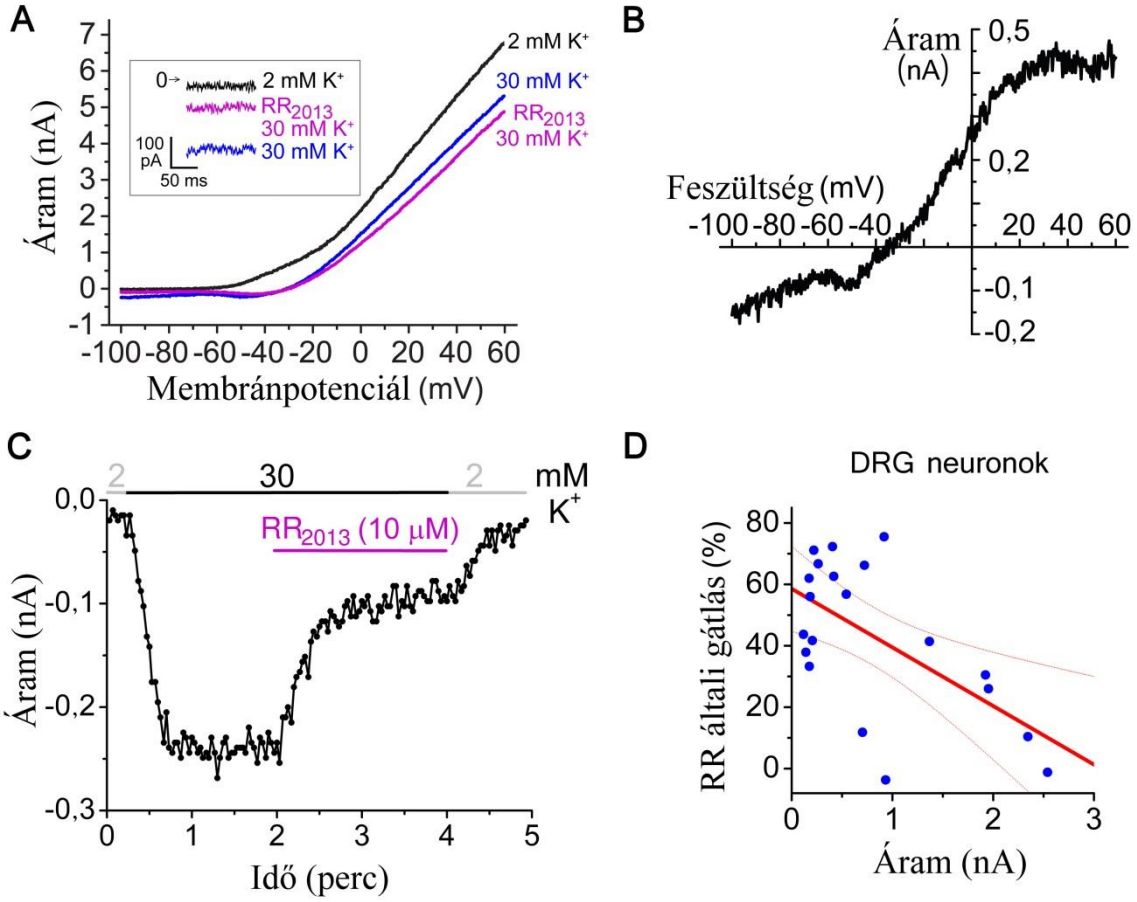
Rágcsálók hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion; DRG) idegsejtjeiben a háttér K^+ áramokat túlnyomórészt a TREK-2 és a TRESK, kisebb arányban a TREK-1 és a TRAAK csatornák biztosítják [78;81;120]. Felnőtt egér DRG neuronjain 37 °C-on, teljes-sejt patch clamp módszerrel vizsgáltuk az RR-érzékeny és hőmérsékletfüggő TREK-2 áramot [32;234].

A DRG neuronok háttér K^+ áramának vizsgálatakor is a *Xenopus* petesejtekben végzett mérésekhez hasonlóan feszültségzár módban, -100 mV-on, a K^+ ionokat nagy (adott esetben 30 mM) koncentrációban tartalmazó EC oldatban vizsgáltuk a polikationos RR (10 μM) hatását. A 24. ábra A-C paneljein egy reprezentatív DRG neuron adatai láthatók, melynek -100 mV-on mérhető háttér K^+ áramát 71%-kal csökkentette a ruténiumvörös. Az A panelen ábrázolt áram–feszültség görbén a pozitív (depolarizált állapotnak megfelelő) membránpotenciálokon a feszültségfüggő K^+ áramok teszik ki az áram nagy részét.

Feltehetőleg ezért gátolt arányában jóval kisebb mértékben a ruténiumvörös ebben a feszültségtartományban, mint -100 mV-on magas $[K^+]$-ban. A -100 mV-on megmutatkozó nagyfokú RR-érzékenység a TREK-2 jelenlétére utal.

Természetesen a szintén RR-érzékeny TRAAK és a TASK-3 lehetséges szerepe is felmerül, azonban irodalmi adatok szerint ezek a csatornák jóval kisebb mértékben járulnak hozzá a DRG neuronok háttér K^+ áramához, vagy legalábbis azoknak egy szűk szubpopulációjában lehetnek számottevők. A DRG háttér K^+ áram RR-re bekövetkező nagyfokú gátlása is a TRAAK döntő szerepe ellen szól, hiszen a TRAAK RR-szenzitivitása nem olyan kifejezett, mint a TREK-2 áramé (18./D ábra).

Az RR kezelés előtti áram–feszültség görbéből kivonva a kezelés után kapott görbét az eredményül adódó különbség áram–feszültség görbe megfelel a ruténiumvörös-érzékeny áramkomponens I–V összefüggésének (24./B ábra). A görbéről leolvasható megfordulási potenciál ($E_{rev} \approx {}^{-}40$ mV) jól közelíti a K^+ ionok adott paraméterek mellett (30 mM $[K^+]_{EC}$, 135 mM $[K^+]_{IC}$, 37 °C) számított egyensúlyi ponteciálértékét.



24. ábra: Egér DRG neuronok ruténiumvörös-érzékeny háttér K^+ áram komponense
(A) Reprezentatív áram–feszültség (I–V) görbék egy jelentősen RR-érzékeny, kis háttér K^+ áram komponenssel rendelkező egér DRG neuronból. A teljes-sejt patch clamp feszültségzár (voltage-clamp) méréseket 2 és 30 mM [K^+]-jú EC oldatokban végeztük, a 10 μM RR-t a 30 mM [K^+]-jú oldathoz adtuk. A feszültségprotokoll elemeiként a -80 mV-os tartófeszültség után egy 200 ms hosszú -100 mV-os feszültséglépés, majd egy 600 ms-os lassú egyenletes depolarizáció következett +60 mV-ra (voltage ramp). Az ábrabetéten a -100 mV-os feszültséglépés végén mért áramgörbék láthatók kinagyítva. **(B)** Az RR által gátolt áramkomponens áram–feszültség (I–V) görbéje az A panelen ábrázolt mérések alapján. Az RR jelenlétében mért áram–feszültség görbét (püspöklila) kivontuk a 30 mM [K^+]-jú oldatban mért görbéből (kék). **(C)** Az A panelen is bemutatott DRG neuron -100 mV-on mért áram értékei az idő függvényében. A mérés folyamán az EC [K^+] változtatásának és az RR adásának időtartamát a görbe fölötti jelölés mutatja. **(D)** Húsz DRG idegsejt háttér K^+ áramának nagysága (nA-ben, az alacsony [K^+]-jú oldatban mért áramra korrigálva), és ezen áramok ruténiumvörös érzékenységének (a gátlás %-ban kifejezve) összefüggése. A kék adatpontokra a STATISTICA programcsomag segítségével elvégzett Pearson-féle produkt-momentum korreláció analízis során regressziós egyenest illesztettünk (folytonos piros vonal). A 95%-os konfidencia intervallumot halványabb vonalak jelölik. ([II]. anyagából módosítva.)

Ugyanezen az ábrarészen látható, hogy a $^{-}60$ és $^{-}40$ mV közötti membránpotenciál tartományban jelentkezik egy kisebb RR-érzékeny feszültségfüggő áramkomponens is, melynek ionszelektivitását nem vizsgáltuk tovább, de megfelelhet a RR irodalomból ismert feszültségfüggő Ca^{2+} csatorna gátló hatásának. Az RR-érzékeny komponens I–V görbéjének $^{+}30$ mV feletti membránpotenciál tartományban felvett telítési jellegéért valószínűleg a pozitív töltésű RR molekula gátló hatására jellemző feszültségfüggés felelős. Az erős depolarizáció és az annak megfelelően megnövekedő K^{+}-ra vonatkozó kifelé irányuló hajtóerő miatt az RR nagyobb valószínűséggel disszociál a kötőhelyéről.

Összesen 20, eltérő nagyságú (16-45 μm átmérőjű) DRG neuron K^{+} áramát vizsgáltuk meg ruténiumvörös-érzékenység szempontjából. Az RR kezelés előtti áramamplitúdók (a 30 és 2 mM [K^{+}]-jú EC oldatban mért befelé irányuló áramok különbsége -100 mV-on) széles tartományban változtak a különböző DRG neuronokon a sejtpopuláció ismert heterogenitásának megfelelően: 120 és 2540 pA közötti értékeket kaptunk. Az RR hatása szintén nagy variabilitást mutatott a gyakorlatilag hatástalan és az akár 75%-os áramcsökkenés között (24./D ábra). Számos idegsejten viszonylag kis K^{+} áramot mértünk (<0,5 nA, 30 mM [K^{+}] EC oldatban, -100 mV-on), és ezt az RR jelentősen gátolta (60-70%, 24./D ábra). Ezt a nagyarányú RR-érzékeny összetevőt minden bizonnyal döntően a TREK-2 árama adja a single channel mérések alapján [78], habár kisebb és sejtenként eltérő mértékben a TRAAK és a TASK-3 áramok is hozzájárulhatnak.

Más neuronokon nagyobb K^{+} áramot (>0,5 nA) detektáltunk, ezeket azonban jóval kevésbé gátolta az RR (<20%). A Pearson-féle produkt-momentum korreláció analízis során gyenge negatív korrelációt találtunk a K^{+} áramamplitúdó és a ruténiumvörös-érzékenység között (r=-0,6; p<0,005). Ez arra utal, hogy a nagyobb K^{+} árammal rendelkező DRG neuronok kisebb arányban fejeznek ki ruténiumvörösre érzékeny háttér K^{+} áram összetevőt, feltehetőleg TREK-2 áramot, mint a kis háttér K^{+} áramú sejtek, amelyeknek árama legtöbbször kifejezetten ruténiumvörös-érzékeny.

7. Megbeszélés

7.1 Általános megfontolások

Értekezésemben a hátsó gyöki ganglion idegsejtek háttér K^+ áramához legnagyobb mértékben hozzájáruló TRESK és TREK-2 csatornák farmakológiai tulajdonságait és szabályozási mechanizmusait vizsgáltam. A háttér K^+ áramok általános jelentősége a nyugalmi membránpotenciál kialakításában és az ingerlékenység szabályozásában elfogadott, azonban a K_{2P} csatornák szerepét a hátsó gyöki ganglion (DRG) idegsejtjeiben arányában keveset vizsgálták (pl. a feszültségfüggő K^+ csatornákhoz, vagy még inkább a TRP csatornákhoz képest). Hozzájárul ehhez, hogy a háttér K^+ áramok molekuláris megfelelőit, a K_{2P} csatornákat csak aránylag későn, 1996 után ismertük meg [11]. Az is hátráltathatta a pszeudounipoláris neuronban a háttér K^+ csatornák jelentőségének felismerését, hogy a leggyakrabban használt elektrofiziológia megközelítés, az áramok teljes-sejt patch clamp mérése során , fiziológiás (alacsony) extracelluláris [K^+]-ban, depolarizált tartományban a háttér K^+ áramok amplitúdója eltörpül a feszültségfüggő K^+ áramokéhoz képest (lásd pl. a kék és püspöklila görbék hozzávetőleges együttfutását +20 és +60 mV között a 24. ábra A paneljén). Hasonlóan kicsiny a háttér K^+ áram amplitúdó az akciós potenciált kialakító feszültségfüggő Na^+ áram maximális nagyságához hasonlítva, ha az izolált DRG neuron sejttesten a Na^+ csatorna küszöbe feletti értékre depolarizáló feszültséglépést alkalmazunk (nem mutatott saját adat).

Fontos azonban szem előtt tartani, hogy a robosztus feszültségfüggő Na^+ és K^+ áramok csak depolarizációra aktiválódnak, és így a nyugalmi membránpotenciál kialakításában nem, vagy kis mértékben játszanak szerepet. Az ingerlékenységet, vagyis hogy az aktuális membránpotenciál mekkora nagyságú depolarizáló árammal mozdítható a feszültségfüggő Na^+ csatorna küszöbéig elsősorban a nyugalmi membránpotenciál környékén is nyitva tartó csatornák határozzák meg, még akkor is, ha ezek áramamplitúdója jóval kisebb, mint a feszültségfüggő csatornáké. A K_{2P} csatornák a membránpotenciál nyugalmi értéke körüli negatív feszültségtartományban (is) aktívak, és emiatt képesek az ingerlékenységet meghatározni. A K_{2P} csatornák áramát a feszültségfüggő K^+ csatornák áramától elkülönítve nyilvánvalóan ez utóbbiak nyitási

küszöbértéke alatt, erősen negatív membránpotenciálon mérhetjük. Fiziológiás extra- és intracelluláris K^+ ionmegoszlás esetén azonban ez a feszültségtartomány túl közel esik a K^+ egyensúlyi potenciáljához, vagyis csak rendkívül kis áramok jelentkeznek. Emiatt végeztük méréseinket rutinszerűen magas (30 vagy 80 mM) extracelluláris [K^+]-ban negatív, -100 mV feszültségértéken.

A hátsó gyöki ganglion idegsejt többféle K_{2P} csatornát is kifejez [1;78;128;212]. Ezek különböző sejt- vagy intracelluláris membrán-doménokban helyezkedhetnek el, de lényeges lehet ez a sokféleség ugyanolyan lokalizációban is, mivel a különböző csatornák más jelátviteli utakat, illetve fizikokémiai tényezőket kapcsolnak háttér K^+ áramuk révén a membránpotenciál és az ingerlékenység szabályozásához. Alig tudunk valamit arról, hogy a DRG neuronokban pontosan melyik jelpálya melyik K_{2P} csatornát szabályozza, és ezen keresztül milyen funkcióban vesz részt. Akadályozza ennek a kérdésnek a vizsgálatát, hogy a különböző K_{2P} csatornák árama nem vagy csak nehezen különíthető el teljes-sejt patch clamp mérésekben. A K_{2P} csatornák dolgozatban leírt eltérő ruténiumvörös érzékenysége, különös tekintettel a nagy szekvenciahasonlóságot mutató TREK-1 és TREK-2 áramára, bizonyos esetekben segítséget nyújthat az egyes háttér K^+ áramok szétválasztásában. A TREK-1 és TREK-2 rendkívül eltérő ruténiumvörös érzékenysége hasonló vizsgálati lehetőségeket rejt magában, mint a munkacsoportunk által régebben leírt TASK-1 és TASK-3 közötti jelentős RR-érzékenységbeli különbségre épülő kísérletek, melyeket azóta széles körben használnak a két közeli rokon TASK csatorna áramának elkülönítésére natív sejtekben [53-55;175;235-243].

A K_{2P} csatornákhoz kapcsolódó egyedi jelpályák vonatkozásában szembeötlő a TRESK áram kalciumfüggő, kalcineurin általi, sokszor drámai mértékű aktivációja, mely a K_{2P} csatornák között egyedi, igen jellegzetes vonás. Emellett a többi K_{2P} csatornához viszonyítva a TRESK sokkal szűkebb körben expresszálódik, mRNS-e nagy mennyiségben a hátsó gyöki ganglionokban és egyéb (pl. trigeminális ganglion) érzőneuronokban, illetve vegetatív ganglionok idegsejtjeiben található meg [68;76;78-80]. Ezek a tényezők azt sugallják, hogy a TRESK csatorna elsősorban szenzoros neuronokra specifikus, kalciumfüggő élettani folyamat(ok)ban vesz részt. Habár jelenleg messze vagyunk a TRESK pontos szerepének tisztázásától, úgy érezzük, hogy e csatorna lokalizációja az orvosi jelentőséggel bíró (pl. fájdalomérzés kialakításáért is

felelős) DRG neuronokban, illetve áramának a központi szerepű kalciumjel általi jelentős aktiválása indokolja, hogy erőfeszítéseket tegyünk a TRESK csatorna működésének és szabályozásának jobb megértésére.

7.2 A TRESK aktivációja sejtvonalban

A TRESK áram kalciumfüggő, kalcineurin általi többszörös aktivációját munkacsoportunk már régen leírta *Xenopus* heterológ expressziós rendszerben. Azonban emlős sejtekben korábban csupán 1,2–1,8-szoros áramfokozódást sikerült megfigyelni, és a pontos mechanizmust sem vizsgálták [78;84]. Kezdetben mi is csak kismértékű áramnövekedést tapasztaltunk, így feltételeztük, hogy a TRESK csatornák már a mérés kezdetén vagy előtte is részlegesen aktivált állapotban lehettek, azaz a direkt, általunk alkalmazott stimulus előtt már valamilyen hatásra aktiválódtak. Ezért a továbbiakban kalciummentes, EGTA-t is tartalmazó oldatokat használtunk, de még így sem sikerült sokkal nagyobb mértékben aktiválni a TRESK áramot. Így terelődött gyanúnk a HEK293 sejtek extracelluláris ATP-re aktiválódó $P2Y_1$ és $P2Y_2$ purinerg G_q-fehérje-kapcsolt receptoraira, illetve arra a lehetőségre, hogy a gigaseal kialakítása előtt valamennyi ATP kiszivároghatott a pipettából, ingerelve ezen purinerg receptorokat, mely a sejten belüli raktárakból kalcium-felszabadulást, és így a TRESK áram aktivációját okozhatta. A kezdeti kalciummentes körülményeket ATP- és GTP-mentes pipettaoldattal kombinálva sikerült a HEK293 sejtvonalban expresszált egér TRESK csatorna jelentős, körülbelül hatszoros aktivációját kimutatni (8./C ábra). Emellett közvetve bizonyítottuk a kalcineurin szabályozó szerepét, mivel mindkét elterjedten használt szelektív kalcineurin inhibitor, az FK506 és a ciklosporin A is már viszonylag alacsony koncentrációban (0,5-1 μM) kivédte az áramaktivációt (8./B és 10. ábrák). Ezzel a *Xenopus* petesejten már kimutatott TRESK-kalcineurin kölcsönhatást [86] emlős sejtekben expresszált csatornán is igazoltuk.

Az extracelluláris oldatba juttatott kalcium ionofór ionomycin a fiziológiáshoz képest tartósabban és nagyobb koncentráció tartományban hoz létre intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedést. A HEK293 sejteken endogén módon kifejeződő M3-as muszkarinos acetilkolin receptorokat EC-an adott karbakollal ingerelve az aktivált G_q fehérje többlépéses folyamat során idéz elő Ca^{2+}-jelet, mely kezdetben a sejten belüli

raktárakból származik. A karbakollal történő ingerléskor is hasonló mértékű TRESK aktivációt kaptunk, mint az ionomycin alkalmazásakor (8./D ábra). A receptoringerlés következtében létrejövő Ca^{2+}-jel inkább megfelel az élettani körülmények között is kialakuló szignálnak az ionomycinnel kiváltotthoz képest. Tehát teljes-sejt patch clamp technikával megfelelő körülmények között emlős sejtvonalban is sikerült az irodalomban korábban leírthoz képest jóval nagyobb mértékű TRESK áramaktivációt létrehozni, a fiziológiás viszonyoknak jobban megfelelő receptorstimuláció útján is.

Az ATP és a Ca^{2+} pipetta- és EC oldatból történő kihagyása a „nyugalmi", túlnyomórészt foszforilált állapotú csatornák fenntartásához szükséges. Azonban az ATP-mentes intracelluláris oldat a kináz általi foszforilációs reakciót megakadályozhatja, ezért a további kísérleteket EC ATP-re érzéketlen sejtvonalban érdemes folytatni, vagy a körülményesebb, de ATP-érzékeny sejteken is kivitelezhető módszerrel, az ún. réteges pipetta elrendezéssel az „ATP-szivárgást" kell elkerülni.

A HEK293 sejtben leírt nagyfokú TRESK aktiváció arra utal, hogy a nyugalmi, gátolt áramért felelős bazális foszforiláció itt is létrejön. Mivel a HEK293 sejt nem polarizált, lehetséges, hogy ebben a sejtben MARK-tól eltérő kináz foszforilálja a csatornát.

Natív sejtekben, elsősorban izolált DRG neuronokon is szeretnénk majd vizsgálni a TRESK áram szabályozási mechanizmusait, előbb azonban el kell különíteni az endogén módon kifejeződő háttér K^+ áramok közül a TRESK komponenst. Ehhez aránylag szűkös farmakológiai eszköztár áll jelenleg rendelkezésünkre: a TREK-2 áram kivédhető ruténiumvörössel, és a TRESK áramról munkacsoportunk régebben kimutatta, hogy a higany (Hg^{2+}) ionok gátolják [99].

7.3 A MARK–TRESK interakció megbeszélése

Elsőként általunk közölt eredmény, miszerint a TRESK csatorna intracelluláris hurokrégióját a MARK kináz foszforilálja. Ez az eredmény váratlan, hiszen a két fehérje funkcionális kapcsolatának lehetősége korábban fel sem merült, és nincs elérhető adat a szakirodalomban arra vonatkozóan, hogy a MARK kináz más ioncsatornát foszforilálna a TRESK-en kívül. Mindenesetre eredményeink kétséget kizáróan bizonyítják, hogy a

MARK2 *in vitro* foszforilálja a TRESK aktivitásának szabályozásáért felelős legfontosabb szerinjeit, és *Xenopus* petesejtekben igen kismértékű kifejezése (0,16 ng/sejt cRNS injektálásával) is erőteljesen gátolja a TRESK áramot. Ezért feltételezhető, hogy a polarizált (pl. ideg-) sejtekben megtalálható MARK kinázok képesek foszforilálni a TRESK-et, amennyiben a csatorna az adott sejtben kifejeződik. A MARK ismert funkcióiból kiindulva felvetődhet annak lehetősége, hogy a TRESK működése valamilyen módon összefüggésben áll a sejtpolaritás [244] vagy a mikrotubulus rendszer [186] szabályozásával, vagy szerepet játszik a primer szenzoros neuron idegrostjainak differenciálódásában, regenerációjában [245-247]. A MARK kináz aktivitását befolyásoló jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képező szignalizációs útvonalak [181-182;248] a TRESK áram aktivitásán keresztül az idegingerlékenységet szabályozhatják.

A MARK-TRESK kölcsönhatás specifikus, hiszen az általunk *Xenopus* rendszerben tesztelt több mint húsz szerin/treonin kináz közül a MARK az egyetlen, mely képes foszforilálni és gátolni a csatornát a Ser^{276} clusteren keresztül. A vizsgált kinázok között szerepelt a széles szubsztrátspecifitással rendelkező protein kináz A és C, illetve a kazein kináz 2, melyekről tudott, hogy számos ioncsatornát foszforilálnak, és ezáltal szabályoznak. Munkacsoportunk megfigyelése, mely szerint *Xenopus* petesejtben a 14-3-3 gátolja a keresett kináz TRESK áramra kifejtett hatását [85], nagyban leszűkítette a szóba jövő lehetséges jelöltek körét [249-250]. A keresett kináz 14-3-3 iránti érzékenysége vezetett a MARK megtalálásához. Mivel a MARK kinázok a sejtpolaritás széles körben elterjedt regulátorai, így elképzelhető, hogy a TRESK csatornát expresszáló sejtekben is jelen vannak, és képesek a Ser^{276} clustert foszforilálni. A MARK3 kináz mRNS-ének axonális transzportját és transzlációját kimutatták felnőtt DRG neuronokban [251]. Mivel a MARK3 a *Xenopus* rendszerben a MARK2-höz hasonlóan gátolja a TRESK csatornát, a két fehérje interakciójának lehetősége adott DRG neuronban is.

Munkám folyamán a MARK kináz TRESK áramra kifejtett hatását *Xenopus* rendszerben vizsgáltuk, azonban fontos lenne ezt emlős sejtvonalra is kiterjeszteni, sőt, akár natív sejtekre is. Eddig a MARK2 együttes expressziójának hatását a TRESK-re HEK293 sejtekben nem tudtuk kimutatni. Ehhez az az irodalmi adatokból ismert tény is hozzájárulhatott, hogy a MARK2 tranziens transzfekcióval kiváltott overexpressziója

toxikus a sejtekre. Szemben a *Xenopus* rendszerrel a kináz kifejezésének mértéke CHO (Chinese Hamster Ovary) sejtekben nem vagy nehezen állítható be tranziens transzfekcióval. Mivel a MARK2 általánosan destabilizálja a mikrotubuláris rendszert, érthető hogy a sejt a tartós túlexpresszió hatására elpusztul [186;195]. Emellett a MARK2 TRESK-re kifejtett hatásának kimutatását HEK293 sejtekben az is nehezíti, hogy a TRESK áram aktivációjához szükséges speciális patch clamp mérési körülmények, például az ATP-mentes IC oldat nem optimális a kináz reakcióhoz. Viszont ennek az oldatnak a használatára szükség van, mert az áram visszaállásában szerepet játszó kináz működésének tanulmányozásához az áramot előzetesen aktiválni kell.

A két-elektródos voltage clamp technika további előnye a rendszer nagyfokú stabilitása, mely jóval kedvezőbb feltételeket teremt az áram visszaállásának vizsgálatához, az ehhez szükséges hosszú mérésekhez, mint a citoplazmát fokozatosan kihígító teljes-sejt patch clamp megközelítés. Ezért a *Xenopus* heterológ expressziós rendszer előnyeit kihasználva vizsgáltuk meg a TRESK áramot szabályozó MARK2 és a vele rokon kinázok hatását. A MARK2 mellett a MARK1 és a MARK3 kétségkívül hasonlóan hatott a TRESK áramra, míg a szintén közeli rokon MARK4 nem gátolta az áramot, még akkor sem, ha cRNS-ét nagy mennyiségben injektáltuk a petesejtekbe. Ezzel szemben a MARK4-nél távolabbi rokon BRSK1 lehetséges, hogy szintén hat a csatornára. A BRSK és a MARK kinázok működésében egyébként több hasonlóság is felfedezhető. A mikrotubulus-asszociált fehérjék közé tartozó szubsztrátjaik közül számos megegyezik, mint például a tau, MAP2 vagy MAP4, valamint az idegsejtek polaritásának kialakításában is van átfedő szerepük [182;248]. A MARK4 viszont egyértelműen rendelkezik olyan tulajdonságokkal, melyek elkülönítik a másik három MARK kináztól. Az egyik ilyen sajátosság, hogy a MARK4 közvetlenül kapcsolódik a tubulinhoz, így a sejt mikrotubulus hálózatához és a centroszómákhoz lokalizálódik [252]. Lehetséges, hogy ez a plazmamembrántól eltérő speciális elhelyezkedés felelős a MARK4 hatástalanságáért a TRESK szabályozás vonatkozásában.

A MARK4-től különböző MARK kinázok működése több ponton is szorosan kapcsolódik a plazmamembránhoz. A MARK2 emlős epitél sejtekben a laterális membránrégióban lokalizálódik, az apikális részen viszont nincs jelen [253]. Itt ugyanis atípusos PKC foszforilációt követően a 14-3-3 állványfehérjéhez kötődik, és leválik a

membránról, a citoplazmába kerül [196-197]. Ez a mechanizmus egyúttal a neuronok polaritásának fenntartásában is szerepet játszik [244]. A MARK kináz-asszociált 1 (KA1) doménja kötheti a foszfatidilszerint, mely közvetlenül a lipid kettősréteghez kapcsolja a kinázt [199]. Tehát a MARK plazmamembránhoz asszociálni képes, dinamikus in vivo lokalizációja lehetővé teszi az ioncsatornákkal való interakciót is.

Az egér TRESK kalcineurinfüggő szabályozásában a Ser 264 és a Ser^{276} cluster a meghatározó, egyéb intracelluláris Ser vagy Thr oldalláncok mutációja nem befolyásolja a folyamatot [68;85]. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy *Xenopus* rendszerben a MARK2 felgyorsítja a TRESK áram visszaállását annak kalciumfüggő aktivációját követően, még akkor is, ha a Ser 264 , az egér TRESK 14-3-3 kötőhelye mutálva van. Ebből arra következtethetünk, hogy a MARK2 hatása nem a Ser 264 foszforilációjával és az ezt követő 14-3-3 fehérje-kötés kialakulásával valósul meg, hanem a Ser^{276} cluster foszforilációja révén gátolja az áramot. Eredményeink alapján azonban nem zárható ki, hogy a kináz egyéb intracelluláris oldalláncokat is foszforilál a TRESK-ben, mindenesetre az kijelenthető, hogyha léteznek is ilyen aminosavak, akkor ezek csak kevésbé befolyásolják a csatorna aktivitását. Továbbá az is lehetséges, hogy a MARK egy, vagy akár több ismeretlen „TRESK-szabályozó” fehérjét (is) foszforilál, különösen annak fényében, hogy az ismert kináz–ioncsatorna szabályozási mechanizmusok esetén általános, hogy az enzim többféle szubsztrátfehérjén keresztül fejti ki a hatását [254]. A TRESK kinázok által történő szabályozásának pontosabb megértéséhez nyilvánvalóan további kísérletek szükségesek.

A konstitutívan aktív MARK2 felgyorsította az aktivált TRESK áram kiindulási szintre történő visszatérését, míg a kinase-dead (kináz inaktív) enzim nem hatott (15. ábra). A MARK kinázok TRESK áramra gyakorolt gátlásához az enzimaktivitásra tehát szükség van, foszforiláció megy végbe, nem pusztán fehérje–fehérje kölcsönhatásról van szó. Korábbi megfigyelésünk szerint a citoplazma 14-3-3 tartalma jelentősen befolyásolja a TRESK áram visszaállási kinetikáját [90]. Ugyanakkor arra a megállapításra jutottunk, hogy a MARK kinázok nem a funkcionálisan elérhető 14-3-3 adapterfehérje mennyiségének számottevő csökkentése és az endogén „TRESK-szabályozó” kináz következményes aktivációja révén fejtik ki hatásukat. A 14-3-3 fehérje overexpressziója tudniillik nem küszöbölte ki a MARK2 hatást (az eredményt nem mutatom). A MARK2 14-3-3 kötését megakadályozó S400A/T539A dupla mutáció

[198] sem befolyásolta a kináz TRESK-gátló hatását. Tehát a MARK2 enzimaktivitására feltétlenül szükség van a TRESK szabályozáshoz és a kináz a hatását elsősorban nem a szabad 14-3-3 adapterfehérje mennyiségének változtatásán keresztül fejti ki.

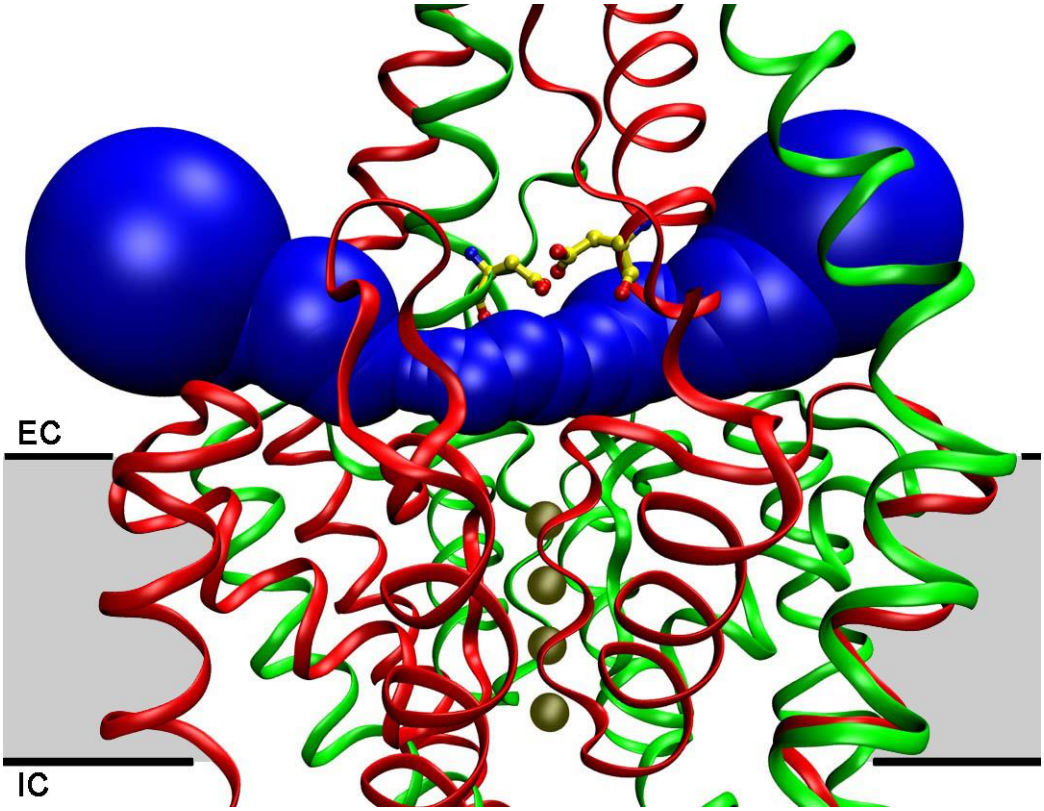
Felvetődik az a lehetőség is, hogy a MARK kinázok esetleg a sejt Ca^{2+}-anyagcseréjének befolyásolásán keresztül gátolják a TRESK áramot. Azonban mivel az áram visszaállását a kalciumjel kiváltásától számolt 5-10 perces időablakokban mértük, így várhatóan a kalcium koncentráció ennyi idő alatt már normalizálódik, és nem lehet a kinetika meghatározója. Kizárja ezt a lehetőséget munkacsoportunk egy korábbi nem közölt eredménye is. Ebben a kísérletben a visszaállási periódus elején 50 nl 50 mM-os EGTA-t mikroinjektáltunk a petesejtbe. Az ilyen EGTA-injektálás teljesen kivédi az injektálást 5 perccel követő kalcium-függő TRESK aktivációt ([68] 4. ábra), azonban nem befolyásolja a már aktivált áram visszaállási kinetikáját (nem közölt eredmény). Tehát a visszaállási kinetika nem kalciumfüggő.

Évekig kerestünk és teszteltünk különböző szerin/treonin kinázokat, számos kinázaktivátorral és inhibitorral kombinálva, hogy vajon képesek-e *Xenopus* petesejtekben a TRESK áramot befolyásolni, míg végül megtaláltuk a MARK kinázokat, melyek az áram gátlása mellett in vitro foszforilálják is a csatorna S274/276/279-es oldalláncait. Természetesen célkitűzéseinken túlmutat az összes lehetséges TRESK-re ható kináz azonosítása. Ezen egyéb vélt kinázoktól függetlenül eredményeinkre alapozva azonban állíthatjuk, hogy a MARK kinázok a *Xenopus* heterológ expressziós rendszerben gátolják a TRESK háttér K^+ áramot. A MARK ezért a továbbiakban a TRESK csatorna szabályozásának vizsgálatában kiemelt fontosságú eszköz, még akkor is, ha egyes natív sejtekben nem ez a kináz felelős a csatorna gátlásáért. Megállapításunknak in vivo jelentőségét az adja, hogy az idegrendszerben expresszálódó TRESK áramot is valószínűleg hasonló módon szabályozzák a MARK kinázok, mint a *Xenopus* petesejtben kifejezett csatornát.

7.4 A ruténiumvörös mint K_{2P} csatorna gátlószer

Habár számos sejttípusban a nyugalmi membránpotenciál fontos meghatározói és szabályozói a K_{2P} háttér K^+ csatornák [12], igen hasonló makroszkópos áramuk farmakológiai elkülönítése még mindig nem teljesen megoldott [94]. Specifikus inhibitorok hiányában minden olyan módszer hasznos lehet, mely egyazon sejten belül képes megkülönböztetni az egyes K_{2P} csatorna típusok áramát. Ezzel magyarázható az egyébként kevésbé specifikus ruténiumvörös széleskörű használata a gyakran egy helyen előforduló TASK-1 és TASK-3 áramok elkülönítésében. Munkánk folyamán újabb, a ruténiumvörös kísérletes farmakológiai célú felhasználását lehetővé tévő felfedezést tettünk: a polikationos festék a közeli rokon, nagyfokú szekvenciabeli identitást mutató TREK-1 és TREK-2 csatornák áramát is képes megkülönböztetni. A TREK-2 áramát ugyanis igen hatékonyan és gyorsan gátolja, a TREK-1 áramot viszont egyáltalán nem befolyásolja. Az eredmény váratlan és meglepő, hiszen a TREK csatornák aminosav-szekvenciája nagyon hasonló, és a jelenleg ismert szabályozási folyamataik többsége is megegyezik. Egy közelmúltban megjelent közleményben a szerzők előre feltételezték, hogy a TREK-2 sem érzékeny a ruténiumvörösre, mint ahogy a TREK-1 sem az [129]. Azonban a ruténiumvörös háttér K^+ áramra kifejtett hatása alegységenként már egy aminosavnyi eltéréskor is megváltozhat, mint ahogy a TASK-1 és TASK-3 esetén, úgy a TREK-1 és TREK-2 csatornáknál is. A TREK-2 csatornában a negatív töltésű, 135-ös aszpartát a ruténiumvörös-érzékenység hordozója, míg az RR-rezisztens TREK-1 csatorna megfelelő 110-es pozíciójában a hidrofób izoleucin található.

A TWIK-1, TREK-1, TREK-2 és TRAAK [22-25] kristályszerkezetek alapján a csatornák pórusának extracelluláris bejáratát az ún. *cap* (sapka) domén fedi. Ezen halad keresztül egy viszonylag rövid, a plazmamembránnal párhuzamos alagútszerű csatorna, az extracelluláris ionút (EIP), mely ily módon az extracelluláris tér és a pórus bejárata között létesít kapcsolatot. Az EIP a pórussal egy T betűhöz hasonló alakzatot képez, ahol a T függőleges szára az ioncsatorna pórusának felel meg, a horizontális szár pedig az EIP-nek (25. ábra). A két alegységből felépülő TREK-2 D135 oldalláncai térben a pórus forgástengelyéhez viszonyítva szimmetrikusan, a szelektivitási filter felett a cap doménban helyezkednek el, és az EIP-t felülről és középtájon határolják.



25. ábra: A humán TREK-2 dimer alegységeinek *D135* aminosava a szelektivitási filter felett az extracelluláris ionútban helyezkedik el. Az ábra a humán TREK-2 kristályszerkezete (PDB ID: 4BW5) alapján a MolAxis [255] és a VMD [256] szoftverek felhasználásával készült. Az extracelluláris ion utat (extracellular ion pathway, EIP) kék gömbök töltik ki, alatta a csatorna függőleges pórusában a négy zöldesbarna gömb K^+ ionokat reprezentál. A D135 (sárga *ball-and-stick* modell szerint ábrázolva, az oxigén- (piros) és nitrogénatomok (kék)) az EIP felső falán, a szelektivitási filter felett található. A csatorna két alegységét pirossal és zölddel, a szalag modell szerint ábrázoltuk. Az ábrázolás síkja nem pontosan merőleges az EIP irányára, hanem a függőleges tengely mentén kissé elfordított, hogy a két alegység 135-ös aszpartátjai külön-külön is láthatóak legyenek. (Az alegységek NSSN és NSSNNS szekvenciáit a felhasznált kristályszerkezeti modell nem oldja fel, de ez nem befolyásolja az EIP megjelenítését.) ([II]. anyagából módosítva.)

Kísérleteink alapján nagyon valószínű, hogy a D135 negatív töltésű aszpartátok az RR elsődleges interakciós partnerei. Az RR kötődése az EIP ezen részéhez elektrosztatikusan és/vagy sztérikusan gátolja a pozitív töltésű K^+ ionok mozgását, vagyis a TREK-2 áramát. Szekvenciájukat összehasonlítva kiderült, hogy a szintén RR-érzékeny TASK-3 70-es, RR-szenzitivitásért felelős glutamátja (E70) és a TREK-2 D135 homológ pozícióban helyezkednek el az első extracelluláris hurokrégióban [229;257], habár a TASK-3 és TREK-2 szekvenciák hasonlósága ebben a régióban nem kifejezett (20./A ábra). A két RR-érzékeny K_{2P} csatorna kérdéses aminosavainak az EIP-hez viszonyított térbeli helyzete a jelenlegi TASK-3 szerkezetmodell, illetve

TREK-2 kristályszerkezet alapján eltérőnek tűnik (vesd össze a 25. ábrát Gonzalez és mtsai. közleményének 1. ábrájával [257]). Természetesen a homológia modell megbízhatósága nem teljes, és a kristályosítási folyamatnak drasztikus hatásai lehetnek a csatorna konformációjára, mint ahogy azt a TRAAK különböző kristályszerkezeteit bemutató közleményekben is láthatjuk [23-24].

A TREK csatornák szabályozása igen összetett, de a TREK-1 és TREK-2 esetén a legtöbb ponton megegyezik. Mindkét csatorna mechanoszenzitív, hőmérséklet-érzékeny, aktiválódnak inhalációs anesztetikumokra, PUFA-kra vagy a sejten belüli savanyodásra, míg a PKA, a PKC és az AMP-aktivált protein kinázok gátlólag hatnak rájuk [12]. Néhány tulajdonságukban azonban eltérnek: az extracelluláris savanyodás a TREK-1 áramot gátolja, míg a TREK-2 áramra serkentőleg hat, melynek hátterében az első extracelluláris hurkon található konzervált hisztidin oldallánc és a szintén extracellulárisan, de nem az első hurkon található töltéssel rendelkező aminosavak állnak [153-154]. A két TREK egyedi csatorna vezetőképessége is eltérő, bár ez a megközelítés a mérési technikán felül további nehézségeket rejt magában, mivel a különböző alternatív transzlációs iniciációs variánsok is más-más vezetőképességgel rendelkeznek [116]. A TREK csatornák központi idegrendszerbeli és perifériás expressziója is különböző, tehát valószínűleg funkciójukban is vannak eltérések [119].

Eredményeink alapján a ruténiumvörös segítségével a TREK-1 és TREK-2 makroszkópos árama megkülönböztethető, így ez a farmakológiai ágens hasznos kiegészítője lehet a két áram szeparálását célzó jelenleg elérhető eszköztárnak. A TREK alcsalád harmadik tagja, a TREK-1 és TREK-2 csatornákhoz képest jelentősebb különbséggel bíró TRAAK áram is gátolható RR-rel, bár nem olyan hatékonyan, mint ahogy azt korábban közöltük [52]. Ugyanis annak ellenére, hogy az 1996-ban vásárolt RR preparátum kevesebb tiszta RR-t tartalmaz, mint a 2013-ban vásárolt készítmény, sokkal hatékonyabban gátolta a TRAAK áramot. Vizsgálatainknak köszönhetően kiderült, hogy a ruténiumibolya (RV) is hozzájárult a régi készítmény nagyobb hatékonyságához. A ruténiumibolya nem ritka szennyező komponense a kereskedelmi forgalomban elérhető, kevésbé tiszta RR készítményeknek. Az RR és RV TRAAK áramra kifejtett gátlásának dózis-hatás görbéjéből számított Hill koefficiensek eltérnek (22./B ábra). Ez nemcsak a TRAAK csatorna és a kétféle ruténium-vegyület eltérő affinitására utal, hanem különböző hatásmechanizmusra is. Valószínűleg a TRAAK

csatornán is EC-an elhelyezkedő negatív töltésű aminosavakon fejti ki hatását a két ruténium-vegyület, de ezen oldalláncok meghatározása nem tűnik könnyen kivitelezhetőnek. Tudniillik az egér TRAAK alegységenként tizennégy negatív töltésű (Asp vagy Glu) és öt hisztidin aminosavat tartalmaz az EC hurokrégióin, melyek közül se a kristályszerkezeti modell, se az összehasonlító szekvenciaanalízis alapján nem találtunk nagyobb valószínűséggel RR (és/vagy RV) interakciós partnerként szóba jövő oldalláncot. Habár számos pont- és duplamutáns egér TRAAK csatornát megvizsgáltunk (az eredményeket nem mutatom), de ezek alapján is nagyszabású vizsgálatsorozatra lesz szükség a TRAAK csatorna RR és RV érzékenységéért felelős aminosavainak azonosításához.

A hátsó gyöki ganglion (DRG) idegsejtjein számos K_{2P} csatornát azonosítottak in situ hibridizációs módszerrel [120]. Az egyes háttér K^+ áramok arányát a teljes K_{2P} áramon belül egyedi csatorna (single channel) mérésekkel határozták meg [78]. A háttér K^+ áram döntő részét a TRESK áram adta 24 °C-on, míg a TREK-2, TREK-1 és TRAAK áramok előfordulása elhanyagolható volt. Magasabb hőmérsékleten, 37 °C-on a TREK-2 dominált, majd gyakoriságban a TRESK következett, végül a TREK-1 és a TRAAK csak ritkán volt megtalálható. Mivel eredményeink szerint a TREK-2 kifejezetten gátolható ruténiumvörössel, adódott a kérdés, hogy kimutatható-e 37 °C-on RR-érzékeny háttér K^+ áram összetevő izolált DRG neuronokon, teljes-sejt patch clamp módszerrel.

Eredményeink alapján a nagyobb DRG neuronok viszonylag nagy háttér K^+ áramában az RR-érzékeny összetevők (TREK-2, TRAAK és TASK-3) csak kisebb arányt képviselnek, míg a kisebb háttér K^+ áramú idegsejtek aránylag nagy RR-érzékenységgel rendelkeznek. Ez összhangban van egy, a közelmúltban megjelent közleménnyel, melyben azt találták, hogy a kisebb átmérőjű, elsősorban C nociceptoroknak megfelelő DRG neuronok jelentős része TREK-2 immunoreaktivitást mutat [258].

Tehát a ruténiumvörös felhasználható a TREK-1 és TREK-2 áramok elkülönítésére heterológ rendszerben és natív sejten egyaránt. Elsőként mértünk patch clamp eljárással teljes-sejt konfigurációban DRG neuronon RR-érzékeny háttér, feltehetőleg TREK-2 K^+ áramot.

8. Következtetések

A DRG neuronok egyik legjelentősebb háttér K^+ csatornája – a TRESK – emlős sejtvonalban kifejezve ez idáig csak kismértékben (20-80%) volt aktiválható a citoplazma [Ca^{2+}] növelésével. Munkám során beállítottam egy olyan teljes-sejt patch clamp mérési eljárást, melynek alkalmazásával sikerült a *Xenopus* rendszerben szokásoshoz hasonló mértékben (4-6-szorosra) aktiválni a HEK293 sejtvonalban kifejezett egér TRESK áramot. Mind az extracellulárisan adott kalcium ionofór ionomycin, mind a G_q fehérje-kapcsolt receptor ingerlése megfelelő aktiváló módszernek bizonyult, és hasonló nagyságú áramnövekedést eredményezett. Mint ahogy már korábban *Xenopus* petesejteken bizonyítottuk, a TRESK áram HEK293 sejtvonalban is az endogén kalcineurin hatására aktiválódik. A kalcineurin specifikus gátlószerei, az FK506 és a ciklosporin A egészen kis koncentrációban kivédték a TRESK áram kalciumfüggő aktivációját sejtvonalban is. Tehát a TRESK aktiváció mechanizmusa megegyezik a béka petesejtben és az emlős sejtvonalban expresszált csatornák esetén, így feltételezhetően a TRESK csatornát fiziológiásan kifejező sejttípusokban is e mechanizmus szerint megy végbe.

Az AMPK rokon protein kinázok közé tartozó MARK kinázok elősegítik az aktivált TRESK áram nyugalmi szintre történő visszaállását, vagyis a csatorna aktivált állapotának megszűnését. Igazoltuk, hogy a kináz enzimaktivitása nélkülözhetetlen, továbbá azonosítottuk, hogy a TRESK hurokrégió mely szerin aminosav-oldalláncai szubsztrátjai a MARK-nak. A négy MARK kináz közül a MARK1, 2 és 3 bizonyult hatékonynak, míg a MARK4 egyáltalán nem befolyásolta a TRESK áramot. In vitro radioaktív foszforilációval kimutattuk, hogy a MARK2 foszforilálja a TRESK csatorna intracelluláris hurokrégióját, azon belül is a Ser274/276/279 cluster szerinjeit, amelyek a csatorna-aktivitás fő meghatározói.

A MARK kinázok és a TRESK csatorna kapcsolatára vonatkozó eredményeink természetesen nem zárják ki annak lehetőségét sem, hogy a MARK *in vivo* nem vagy csak közvetve hat a TRESK áramra, illetve az áramot más, a MARK-tól független kinázok is befolyásolják, mint ahogy a PKA-ról munkacsoportunk korábban igazolta is ezt.

A TRESK–MARK kölcsönhatás felveti a lehetőségét, hogy összefüggés áll fenn a sejtpolaritás, a mikrotubulus dinamika vagy az idegrostok differenciálódása és a TRESK csatorna, ill. a rajta keresztülfolyó háttér K^+ áram szabályozása között.

Disszertációm második felében a polikationos ruténiumvörös (RR) különböző háttér K^+ csatornákra kifejtett hatását vizsgáltam. A festék a TREK-2 áram igen potens és gyors kinetikával jellemezhető inhibitora, míg a közeli rokon TREK-1 áramra teljesen hatástalan. Az RR és a TREK-2 közötti kölcsönhatásért egyetlen aminosav, az első extracelluláris hurkon (a *cap* doménban) elhelyezkedő (egér TREK-2 *c* variánsban a 135-ös pozíciójú) konzervált Asp felelős. Ha a dimer szerkezetű csatorna egyik alegységéből hiányzik a kérdéses Asp, az RR hatása mérséklődik. A kristályszerkezeti modellek alapján ezek az Asp aminosavak az extracelluláris ionút (EIP) felső részén, közvetlenül a pórus bejárata felett találhatók. Valószínűleg a relatíve nagy, többszörösen pozitív töltésű ruténiumvörös molekula elektrosztatikusan és/vagy sztérikusan, az EIP és a pórusnyílás határán beékelődve korlátozza a szintén kation K^+ ionok átjutását, ezáltal gátolja a csatorna áramát. A szóban forgó Asp a szintén RR-érzékeny TASK-3 RR-szenzitivitásért felelős aminosavának (E70) megfelelő pozíciójú.

A korábban szintén nagymértékben RR-szenzitívnek bizonyuló TRAAK áramot az újabb, és tisztább RR preparátum sokkal kevésbé gátolta. Bebizonyítottuk, hogy a régi és az új RR készítmények közötti különbség oka részben a ruténiumibolya (RV), egy nem ritka szennyező komponens. Feltehetőleg az RR és az RV TRAAK áramra kifejtett hatásmechanizmusa is eltérő, melyre a jelentősen különböző Hill koefficiensekből következtethetünk. Érdekes módon a hatás jellegét tekintve a többi, általunk megvizsgált K_{2P} csatorna esetén nem volt különbség az RR és az RV között.

Hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronon elsőként mértünk patch clamp eljárással teljes-sejt konfigurációban RR-érzékeny háttér, feltehetőleg TREK-2 K^+ áramot. A szintén RR-érzékeny TRAAK és TASK-3 csatornák az expressziós és funkcionális vizsgálatok alapján is csak igen kis arányban találhatók meg a DRG neuronokon a TREK-2, a TRESK és a TREK-1 csatornákhoz képest. Az idegsejtek háttér K^+ árama és RR-érzékenysége negatív korrelációt mutatott, mely arra utal, hogy a kisebb háttér K^+ árammal rendelkező neuronok arányában nagyobb RR-szenzitív összetevőt tartalmaznak.

9. Összefoglalás

Az általunk vizsgált TRESK és TREK-2 K_{2P} csatornákon folyó áramok a hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronok háttér K^+ áramának legjelentősebb komponensei. A membránpotenciál szabályozásával, az ingerlékenység csökkentésével fontos szerepet töltenek be számos más ingerlékeny és nem excitábilis sejttípusban is. A *Xenopus* petesejtben expresszált TRESK áram aktivációja során a kalcineurin defoszforilálja a csatorna intracelluláris hurokrégiójának bizonyos szerin oldalláncait. Ph.D. munkám során a TRESK kalciumfüggő, kalcineurin általi többszörös aktivációját emlős sejtvonalban (HEK293) is kimutattuk teljes-sejt patch clamp eljárással. Nagyszámú szerin/treonin kináz *Xenopus* rendszerben történt vizsgálatával megtaláltuk a MARK2 kinázt, mely képes *in vitro* foszforilálni a csatorna kérdéses szerinjeinek egyik csoportját. A MARK2 ezáltal felgyorsítja a kalciumfüggő áramaktiváció megszűnésének folyamatát, végső soron gátolja a TRESK áramot. Kimutattuk, hogy a MARK2 aktív kináz doménja nélkülözhetetlen a TRESK áramra kifejtett hatásához, valamint meghatároztuk, hogy a TRESK szabályozásban résztvevő szerinek közül melyeket foszforilálja. Tisztázásra vár, hogy milyen összefüggés van a MARK kinázok által kontrollált mikrotubulus dinamika és a sejtpolaritás szabályozása, valamint a TRESK csatorna, ill. a TRESK árama között.

Értekezésem másik részében részletesen tanulmányoztuk a ruténiumvörös (RR) és a K_{2P} csatornák közötti interakciót, a polikationos festék áramamplitúdóra gyakorolt hatására koncentrálva. A TASK-3 és TRAAK már ismert, nagyfokú RR-érzékenységét újból megerősítettük, azzal a különbséggel, hogy a TRAAK áramot az újabb és tisztább RR készítmény csak kisebb mértékben gátolta. Ehhez hozzájárult a régi készítményben szennyezőként fellelhető ruténiumibolya, mely hatékonyabb gátlószere a TRAAK áramnak, mint az RR. Új eredmény, hogy extracelluláris RR jelenlétében a TREK-2 erőteljesen és gyorsan gátlódik, a TREK-1 áram azonban változatlan marad. Igazoltuk, hogy az RR a TREK-2 mindkét alegységének *cap* doménjában található konzervált, 135-ös aszpartátjaival lép kölcsönhatásba, melyek megléte elengedhetetlen a teljes gátláshoz. Sikerült emellett felnőtt egér DRG neuronjain 37 °C-on RR-szenzitív háttér K^+ áram komponenst elkülönítenünk, mellyel natív sejteken igazoltuk az RR alkalmazhatóságát a háttér K^+ áramok vizsgálatában.

10. Summary

The currents of the K_{2P} channels TRESK and TREK-2 are major determinants of the background K^+ current of dorsal root ganglion (DRG) neurons. They also play an important role in several other excitable and non-excitable cell types by regulating the membrane potential and by reducing the excitability. TRESK, expressed in *Xenopus* oocytes, is activated by calcineurin via the dephosphorylation of serine residues in the intracellular loop region of the channel. In my Ph.D. studies, the several-fold activation of TRESK by the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin has also been demonstrated in a mammalian cell line (HEK293) by applying the whole-cell patch clamp method. In the *Xenopus* expression system, we have investigated a high number of different serine/threonine kinase types and identified MARK2, which phosphorylates a cluster of the regulatory serines of the channel *in vitro*. Thereby MARK2 accelerates the recovery from the calcium-dependent activation, in fact it inhibits the TRESK current. We have shown that the active kinase domain of MARK2 is indispensable for the effect on TRESK, and also determined which serine residues of TRESK are phosphorylated by MARK2. It remains to be established how the microtubule dynamics and cell polarity, which are directly controlled by MARK kinases are related to the TRESK channel and the regulation of TRESK current.

In the other part of my Ph.D. thesis the interaction between ruthenium red (RR) and the different K_{2P} channels has been comprehensively analyzed, with special focus on the effect of the polycationic dye on the current amplitudes. The considerable RR-sensitivity of TASK-3 and TRAAK channels has been verified, with the exception that the presently applied new pure RR preparation inhibited TRAAK less than in the previous report from our laboratory. Ruthenium violet, a contaminating compound in the RR preparation used in the previous study, is a more potent inhibitor of TRAAK than RR. TREK-2 is robustly and rapidly inhibited by the extracellular application of RR, whereas TREK-1 is not affected. RR interacts with aspartate 135 located in the *cap* domains of TREK-2 subunits. Both of these aspartates are indispensable for the efficient inhibition of TREK-2 by RR. A RR-sensitive background K^+ current component was detected in mouse DRG neurons at 37 °C indicating that RR can also be applied for the characterization of K_{2P} currents in native cells.

11. Irodalomjegyzék

1. Pollema-Mays SL, Centeno MV, Ashford CJ, Apkarian AV, Martina M. (2013) Expression of background potassium channels in rat DRG is cell-specific and down-regulated in a neuropathic pain model. Mol Cell Neurosci, 57: 1-9.

2. Zhou J, Yang CX, Zhong JY, Wang HB. (2013) Intrathecal TRESK gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. Neuroreport, 24: 131-136.

3. Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J, Gasull X. (2011) TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. Mol Pain, 7: 30-46.

4. Mathie A, Veale EL. (2014) Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. Pflugers Arch, 467: 931-943.

5. Bertil Hille. (2001) Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Sunderland.

6. Jenkinson DH. (2006) Potassium channels − multiplicity and challenges. Br J Pharmacol, 147 (Suppl 1): S63-S71.

7. MacKinnon R. (2003) Potassium channels. FEBS Lett, 555: 62-65.

8. Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T. (2014) Potassium channels: structures, diseases, and modulators. Chem Biol Drug Des, 83: 1-26.

9. Hodgkin AL, Huxley AF. (1947) Potassium leakage from an active nerve fibre. J Physiol, 106: 341-367.

10. Hodgkin AL, Huxley AF. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J Physiol, 117: 500-544.

11. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K^+ channel with a novel structure. EMBO J, 15: 1004-1011.

12. Enyedi P, Czirjak G. (2010) Molecular background of leak K^+ currents: two-pore domain potassium channels. Physiol Rev, 90: 559-605.

13. Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, Pausch MH. (1996) ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from Drosophila melanogaster by expression in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 13256-13261.

14. Kunkel MT, Johnstone DB, Thomas JH, Salkoff L. (2000) Mutants of a temperature-sensitive two-P domain potassium channel. J Neurosci, 20: 7517-7524.

15. Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, Muller-Rober B. (1997) New structure and function in plant K^+ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca^{2+} dependency. EMBO J, 16: 2565-2575.

16. Moshelion M, Becker D, Czempinski K, Mueller-Roeber B, Attali B, Hedrich R, Moran N. (2002) Diurnal and circadian regulation of putative potassium channels in a leaf moving organ. Plant Physiol, 128: 634-642.

17. Feliciangeli S, Chatelain FC, Bichet D, Lesage F. (2015) The family of K2P channels: salient structural and functional properties. J Physiol, 593: 2587-2603.

18. Bockenhauer D, Nimmakayalu MA, Ward DC, Goldstein SA, Gallagher PG. (2000) Genomic organization and chromosomal localization of the murine 2 P domain potassium channel gene Kcnk8: conservation of gene structure in 2 P domain potassium channels. Gene, 261: 365-372.

19. Salinas M, Reyes R, Lesage F, Fosset M, Heurteaux C, Romey G, Lazdunski M. (1999) Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. J Biol Chem, 274: 11751-11760.

20. Kim D, Gnatenco C. (2001) TASK-5, a new member of the tandem-pore K^+ channel family. Biochem Biophys Res Commun, 284: 923-930.

21. Blin S, Chatelain FC, Feliciangeli S, Kang D, Lesage F, Bichet D. (2014) Tandem Pore Domain Halothane-Inhibited K^+ Channel Subunits THIK1 and THIK2 Assemble and Form Active Channels. J Biol Chem, 289: 28202-28212.

22. Miller AN, Long SB. (2012) Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. Science, 335: 432-436.

23. Brohawn SG, del MJ, MacKinnon R. (2012) Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K^+ ion channel. Science, 335: 436-441.

24. Brohawn SG, Campbell EB, MacKinnon R. (2013) Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K^+ channel. Proc Natl Acad Sci U S A, 110: 2129-2134.

25. Dong YY, Pike AC, Mackenzie A, McClenaghan C, Aryal P, Dong L, Quigley A, Grieben M, Goubin S, Mukhopadhyay S, Ruda GF, Clausen MV, Cao L, Brennan PE, Burgess-Brown NA, Sansom MS, Tucker SJ, Carpenter EP. (2015) K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. Science, 347: 1256-1259.

26. Rajan S, Wischmeyer E, Xin LG, Preisig-Muller R, Daut J, Karschin A, 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.

27. Talley EM, Bayliss DA, (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.

28. Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. J Biol Chem, 274: 26691-26696.

29. Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K^+ channel. EMBO J, 17: 4283-4290.

30. Kim Y, Gnatenco C, Bang H, Kim D. (2001) Localization of TREK-2 K^+ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. Pflugers Arch, 442: 952-960.

31. Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. (2000) TREK-1 is a heat-activated background K^+ channel. EMBO J, 19: 2483-2491.

32. Kang D, Choe C, Kim D. (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K^+ channels TREK-2 and TRAAK. J Physiol, 564: 103-116.

33. Murbartian J, Lei Q, Sando JJ, Bayliss DA. (2005) Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. J Biol Chem, 280: 30175-30184.

34. Honore E, Maingret F, Lazdunski M, Patel AJ. (2002) An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K^+ channel TREK-1. EMBO J, 21: 2968-2976.

35. Piechotta PL, Rapedius M, Stansfeld PJ, Bollepalli MK, Erhlich G, Andres-Enguix I, Fritzenschaft H, Decher N, Sansom MS, Tucker SJ, Baukrowitz T. (2011) The pore structure and gating mechanism of K2P channels. EMBO J, 30: 3607-3619.

36. Brohawn SG, Campbell EB, MacKinnon R. (2014) Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K^+ channel. Nature, 516: 126-130.

37. Chavez RA, Gray AT, Zhao BB, Kindler CH, Mazurek MJ, Mehta Y, Forsayeth JR, Yost CS. (1999) TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. J Biol Chem, 274: 7887-7892.

38. Lesage F, Lauritzen I, Duprat F, Reyes R, Fink M, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997) The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K^+ channel. FEBS Lett, 402: 28-32.

39. Arrighi I, Lesage F, Scimeca JC, Carle GF, Barhanin J. (1998) Structure, chromosome localization, and tissue distribution of the mouse twik K^+ channel gene. FEBS Lett, 425: 310-316.

40. Nicolas MT, Barhanin J, Reyes R, Dememes D. (2003) Cellular localization of TWIK-1, a two-pore-domain potassium channel in the rodent inner ear. Hear Res, 181: 20-26.

41. Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H, Bretz AC, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T. (2008) p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. EMBO J, 27: 792-803.

42. Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M. (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K^+ channel. EMBO J, 15: 6854-6862.

43. Bang H, Kim Y, Kim D. (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K^+ channel family. J Biol Chem, 275: 17412-17419.

44. Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K^+ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. J Biol Chem, 275: 28398-28405.

45. Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M. (1998) A neuronal two P domain K^+ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. EMBO J, 17: 3297-3308.

46. Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997) TASK, a human background K^+ channel to sense external pH variations near physiological pH. EMBO J, 16: 5464-5471.

47. Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DM, Chavez RA, Forsayeth JR, Yost CS. (1998) An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. J Neurosci, 18: 868-877.

48. Kim Y, Bang H, Kim D. (2000) TASK-3, a new member of the tandem pore $K(^+)$ channel family. J Biol Chem, 275: 9340-9347.

49. Czirjak G, Fischer T, Spat A, Lesage F, 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.

50. Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, El Wakil A, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, Barhanin J. (2008) Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. EMBO J, 27: 179-187.

51. Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ. (2008) TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. Proc Natl Acad Sci U S A, 105: 2203-2208.

52. Czirjak G, Enyedi P. (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. J Biol Chem, 277: 5426-5432.

53. Berg AP, Talley EM, Manger JP, Bayliss DA. (2004) Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K^+ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. J Neurosci, 24: 6693-6702.

54. Kang D, Han J, Talley EM, Bayliss DA, Kim D. (2004) Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. J Physiol, 554: 64-77.

55. Kim D, Cavanaugh EJ, Kim I, Carroll J. (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.

56. Girard C, Duprat F, Terrenoire C, Tinel N, Fosset M, Romey G, Lazdunski M, Lesage F. (2001) Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K^+ channels. Biochem Biophys Res Commun, 282: 249-256.

57. Decher N, Maier M, Dittrich W, Gassenhuber J, Bruggemann A, Busch AE, Steinmeyer K. (2001) Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. FEBS Lett, 492: 84-89.

58. Reyes R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N, Lazdunski M. (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K^+ channel from human kidney. J Biol Chem, 273: 30863-30869.

59. Duprat F, Girard C, Jarretou G, Lazdunski M. (2005) Pancreatic two P domain K^+ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. J Physiol, 562: 235-244.

60. Fong P, Argent BE, Guggino WB, Gray MA. (2003) Characterization of vectorial chloride transport pathways in the human pancreatic duct adenocarcinoma cell line HPAF. Am J Physiol Cell Physiol, 285: C433-C445.

61. Warth R, Barriere H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, Barhanin J. (2004) Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K^+ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. Proc Natl Acad Sci U S A, 101: 8215-8220.

62. Gonczi M, Szentandrassy N, Johnson IT, Heagerty AM, Weston AH. (2006) Investigation of the role of TASK-2 channels in rat pulmonary arteries; pharmacological and functional studies following RNA interference procedures. Br J Pharmacol, 147: 496-505.

63. Chvanov M, Petersen OH, Tepikin A. (2005) Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 360: 2273-2284.

64. Rajan S, Wischmeyer E, Karschin C, Preisig-Muller R, Grzeschik KH, Daut J, Karschin A, Derst C. (2001) THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K^+ channels. J Biol Chem, 276: 7302-7311.

65. Chatelain FC, Bichet D, Feliciangeli S, Larroque MM, Braud VM, Douguet D, Lesage F. (2013) Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K^+ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. J Biol Chem, 288: 35081-35092.

66. Renigunta V, Zou X, Kling S, Schlichthorl G, Daut J. (2013) Breaking the silence: functional expression of the two-pore-domain potassium channel THIK-2. Pflugers Arch, 466: 1735-1745.

67. Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Kitada C, Yokoi H, Nozawa K, Okada H, Matsushime H, Furuichi K. (2003) A novel two-pore domain K^+ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. J Biol Chem, 278: 27406-27412.

68. Czirjak G, Toth ZE, Enyedi P. (2004) The two-pore domain K^+ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. J Biol Chem, 279: 18550-18558.

69. Kang D, Mariash E, Kim D. (2004) Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K^+ channel family. J Biol Chem, 279: 28063-28070.

70. Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M. (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K^+ channels. Nat Neurosci, 2: 422-426.

71. Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, III, Bayliss DA. (2000) The TASK-1 two-pore domain K^+ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. J Neurosci, 20: 6347-6354.

72. Lazarenko RM, Willcox SC, Shu S, Berg AP, Jevtovic-Todorovic V, Talley EM, Chen X, Bayliss DA. (2010) Motoneuronal TASK Channels Contribute to Immobilizing Effects of Inhalational General Anesthetics. Journal of Neuroscience, 30: 7691-7704.

73. Pang DS, Robledo CJ, Carr DR, Gent TC, Vyssotski AL, Caley A, Zecharia AY, Wisden W, Brickley SG, Franks NP. (2009) An unexpected role for TASK-3 potassium channels in network oscillations with implications for sleep mechanisms and anesthetic action. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 17546-17551.

74. Harinath S, Sikdar SK. (2004) Trichloroethanol enhances the activity of recombinant human TREK-1 and TRAAK channels. Neuropharmacology, 46: 750-760.

75. Gruss M, Bushell TJ, Bright DP, Lieb WR, Mathie A, Franks NP. (2004) Two-pore-domain K^+ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. Molecular Pharmacology, 65: 443-452.

76. Keshavaprasad B, Liu C, Au JD, Kindler CH, Cotten JF, Yost CS. (2005) Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. Anesth Analg, 101: 1042-1049.

77. Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, Lazdunski M. (2004) TREK-1, a K^+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. EMBO J, 23: 2684-2695.

78. Kang D, Kim D. (2006) TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K^+ channels in dorsal root ganglion neurons. Am J Physiol Cell Physiol, 291: C138-C146.

79. Bautista DM, Sigal YM, Milstein AD, Garrison JL, Zorn JA, Tsuruda PR, Nicoll RA, Julius D. (2008) Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. Nat Neurosci, 11: 772-779.

80. Cadaveira-Mosquera A, Perez M, Reboreda A, Rivas-Ramirez P, Fernandez-Fernandez D, Lamas JA. (2012) Expression of K2P Channels in Sensory and Motor Neurons of the Autonomic Nervous System. J Mol Neurosci, 48: 86-96.

81. Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R, Wischmeyer E, Doring F. (2007) TRESK two-pore-domain K^+ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. J Physiol, 585: 867-879.

82. Millar JA, Barratt L, Southan AP, Page KM, Fyffe REW, Robertson B, 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.

83. Talley EM, Lei Q, Sirois JE, Bayliss DA. (2000) TASK-1, a two-pore domain K^+ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. Neuron, 25: 399-410.

84. Kang D, Kim GT, Kim EJ, La JH, Lee JS, Lee ES, Park JY, Hong SG, Han J. (2008) Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. Biochem Biophys Res Commun, 367: 609-615.

85. Czirjak G, Enyedi P. (2010) Tresk background K^+ channel is inhibited by phosphorylation via two distinct pathways. J Biol Chem, 285: 14549-14557.

86. Czirjak G, Enyedi P. (2006) Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K^+ channel, TRESK. J Biol Chem, 281: 14677-14682.

87. Czirjak G, Enyedi P. (2014) The LQLP Calcineurin-docking Site Is a Major Determinant of the Calcium-dependent Activation of Human TRESK Background K^+ Channel. J Biol Chem, 289: 29506-20518.

88. Norris CM, Blalock EM, Chen KC, Porter NM, Landfield PW. (2002) Calcineurin enhances L-type Ca^{2+} channel activity in hippocampal neurons: increased effect with age in culture. Neuroscience, 110: 213-225.

89. Nystoriak MA, Nieves-Cintron M, Nygren PJ, Hinke SA, Nichols CB, Chen CY, Puglisi JL, Izu LT, Bers DM, Dell'acqua ML, Scott JD, Santana LF, Navedo MF. (2014) AKAP150 contributes to enhanced vascular tone by facilitating large-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel remodeling in hyperglycemia and diabetes mellitus. Circ Res, 114: 607-615.

90. Czirjak G, Vuity D, Enyedi P. (2008) Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. J Biol Chem, 283: 15672-15680.

91. Enyedi P, Veres I, Braun G, Czirjak G. (2014) Tubulin binds to the cytoplasmic loop of TRESK background K^+ channel in vitro. PLoS One, 9: e97854.

92. Gendreau S, Schirmer J, Schmalzing G. (2003) Identification of a tubulin binding motif on the $P2X_2$ receptor. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 786: 311-318.

93. Rahm AK, Gierten J, Kisselbach J, Staudacher I, Staudacher K, Schweizer PA, Becker R, Katus HA, Thomas D. (2011) Protein kinase C-dependent activation of human $K_{2P}18.1$ K^+ channels. Br J Pharmacol, 166: 764-773.

94. Lotshaw DP. (2007) Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K^+ channels. Cell Biochem Biophys, 47: 209-256.

95. Liu C, Au JD, Zou HL, Cotten JF, Yost CS. (2004) Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. Anesth Analg, 99: 1715-1722.

96. Yost CS. (2000) Tandem pore domain K channels: an important site of volatile anesthetic action? Curr Drug Targets, 1: 207-217.

97. Yoo S, Liu J, Sabbadini M, Au P, Xie GX, Yost CS. (2009) Regional expression of the anesthetic-activated potassium channel TRESK in the rat nervous system. Neurosci Lett, 465: 78-84.

98. Chae YJ, Zhang J, Au P, Sabbadini M, Xie GX, Yost CS. (2010) Discrete change in volatile anesthetic sensitivity in mice with inactivated tandem pore potassium ion channel TRESK. Anesthesiology, 113: 1326-1337.

99. Czirjak G, Enyedi P. (2006) Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K^+ channels. Mol Pharmacol, 69: 1024-1032.

100. Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thummler S, Peng XD, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois JM, Debonnel G, Lazdunski M. (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. Nat Neurosci, 9: 1134-1141.

101. Wright PD, Weir G, Cartland J, Tickle D, Kettleborough C, Cader MZ, Jerman J. (2013) Cloxyquin (5-chloroquinolin-8-ol) is an activator of the two-pore domain potassium channel TRESK. Biochem Biophys Res Commun, 441: 463-468.

102. Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube MP, Marcinkiewicz MM, Ramagopalan S, Ansorge O, Brais B, Sequeiros J, Pereira-Monteiro JM, Griffiths LR, Tucker SJ, Ebers G, Rouleau GA. (2010) A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. Nature Medicine, 16: 1157-1160.

103. Guo Z, Cao YQ. (2014) Over-Expression of TRESK K^+ Channels Reduces the Excitability of Trigeminal Ganglion Nociceptors. PLoS One, 9: e87029.

104. Koo JY, Jang Y, Cho H, Lee CH, Jang KH, Chang YH, Shin J, Oh U. (2007) Hydroxy-alpha-sanshool activates TRPV1 and TRPA1 in sensory neurons. Eur J Neurosci, 26: 1139-1147.

105. Tsunozaki M, Lennertz RC, Vilceanu D, Katta S, Stucky CL, Bautista DM. (2013) A 'toothache tree' alkylamide inhibits A_{delta} mechanonociceptors to alleviate mechanical pain. J Physiol, 591: 3325-3340.

106. Riera CE, Menozzi-Smarrito C, Affolter M, Michlig S, Munari C, Robert F, Vogel H, Simon SA, le Coutre J. (2009) Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels. Br J Pharmacol, 157: 1398-1409.

107. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. Nat Med, 8: 136-142.

108. Zhang X, Levy D, Noseda R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. (2010) Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. J Neurosci, 30: 8807-8814.

109. Maher BH, Taylor M, Stuart S, Okolicsanyi RK, Roy B, Sutherland HG, Haupt LM, Griffiths LR. (2013) Analysis of 3 common polymorphisms in the KCNK18 gene in an Australian Migraine Case-control cohort. Gene, 528: 343-346.

110. Andres-Enguix I, Shang L, Stansfeld PJ, Morahan JM, Sansom MS, Lafreniere RG, Roy B, Griffiths LR, Rouleau GA, Ebers GC, Cader ZM, Tucker SJ. (2012) Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K channel. Sci Rep, 2: 237-243.

111. Rainero I, Rubino E, Gallone S, Zavarise P, Carli D, Boschi S, Fenoglio P, Savi L, Gentile S, Benna P, Pinessi L, Dalla VG. (2014) KCNK18 (TRESK) Genetic Variants in Italian Patients With Migraine. Headache, 54: 1515-1522.

112. Lesage F, Maingret F, Lazdunski M. (2000) Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K^+ channel. FEBS Lett, 471: 137-140.

113. Gu W, Schlichthorl G, Hirsch JR, Engels H, Karschin C, Karschin A, Derst C, Steinlein OK, Daut J. (2002) Expression pattern and functional characteristics of two novel splice variants of the two-pore-domain potassium channel TREK-2. J Physiol, 539: 657-668.

114. Ozaita A, Vega-Saenz dM. (2002) Cloning of two transcripts, HKT4.1a and HKT4.1b, from the human two-pore K^+ channel gene KCNK4. Chromosomal localization, tissue distribution and functional expression. Brain Res Mol Brain Res, 102: 18-27.

115. Thomas D, Plant LD, Wilkens CM, McCrossan ZA, Goldstein SA. (2008) Alternative translation initiation in rat brain yields K_{2P}2.1 potassium channels permeable to sodium. Neuron, 58: 859-870.

116. Simkin D, Cavanaugh EJ, Kim D. (2008) Control of the single channel conductance of K_{2P}10.1 (TREK-2) by the amino-terminus: role of alternative translation initiation. J Physiol, 586: 5651-5663.

117. Bockenhauer D, Zilberberg N, Goldstein SA. (2001) KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. Nat Neurosci, 4: 486-491.

118. Maingret F, Honore E, Lazdunski M, Patel AJ. (2002) Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K^+ channel. Biochem Biophys Res Commun, 292: 339-346.

119. Noel J, Sandoz G, Lesage F. (2011) Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. Channels (Austin), 5: 402-409.

120. Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. J Neurosci, 21: 7491-7505.

121. Aller MI, Wisden W. (2008) Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. Neuroscience, 151: 1154-1172.

122. Han J, Truell J, Gnatenco C, Kim D. (2002) Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. J Physiol, 542: 431-444.

123. Gnatenco C, Han J, Snyder AK, Kim D. (2002) Functional expression of TREK-2 K^+ channel in cultured rat brain astrocytes. Brain Res, 931: 56-67.

124. Zhou M, Xu G, Xie M, Zhang X, Schools GP, Ma L, Kimelberg HK, Chen H. (2009) TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. J Neurosci, 29: 8551-8564.

125. Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noel J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. (2006) TREK-1, a K^+ channel involved in polymodal pain perception. EMBO J, 25: 2368-2376.

126. Noel J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. (2009) The mechano-activated K^+ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. EMBO J, 28: 1308-1318.

127. Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, Francois A, Ling B, Maffre V, Couette B, Busserolles J, Courteix C, Noel J, Lazdunski M, Eschalier A, Authier N, Bourinet E. (2011) Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. EMBO Mol Med, 3: 266-278.

128. Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kelsell RE, Gloger II, Pangalos MN. (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. Brain Res Mol Brain Res, 86: 101-114.

129. Cadaveira-Mosquera A, Ribeiro SJ, Reboreda A, Perez M, Lamas JA. (2011) Activation of TREK currents by the neuroprotective agent riluzole in mouse sympathetic neurons. J Neurosci, 31: 1375-1385.

130. Zhao H, Sprunger LK, Simasko SM. (2010) Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 298: G212-G221.

131. Blondeau N, Petrault O, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R, Lazdunski M, Heurteaux C. (2007) Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. Circ Res, 101: 176-184.

132. Garry A, Sigaudo-Roussel D, Merzeau S, Dumont O, Saumet JL, Fromy B. (2005) Cellular mechanisms underlying cutaneous pressure-induced vasodilation: in vivo involvement of potassium channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 289: H174-H180.

133. Xian TL, Dyachenko V, Zuzarte M, Putzke C, Preisig-Muller R, Isenberg G, Daut J. (2006) The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. Cardiovasc Res, 69: 86-97.

134. Baker SA, Hatton WJ, Han J, Hennig GW, Britton FC, Koh SD. (2010) Role of TREK-1 potassium channel in bladder overactivity after partial bladder outlet obstruction in mouse. J Urol, 183: 793-800.

135. Buxton IL, Heyman N, Wu YY, Barnett S, Ulrich C. (2011) A role of stretch-activated potassium currents in the regulation of uterine smooth muscle contraction. Acta Pharmacol Sin, 32: 758-764.

136. Sanders KM, Koh SD. (2006) Two-pore-domain potassium channels in smooth muscles: new components of myogenic regulation. J Physiol, 570: 37-43.

137. Gurney A, Manoury B. (2009) Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. Eur Biophys J, 38: 305-318.

138. Kelly D, Mackenzie L, Hunter P, Smaill B, Saint DA. (2006) Gene expression of stretch-activated channels and mechanoelectric feedback in the heart. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 33: 642-648.

139. Inglis SK, Brown SG, Constable MJ, McTavish N, Olver RE, Wilson SM. (2007) A Ba^{2+}-resistant, acid-sensitive K^+ conductance in Na^+-absorbing H441 human airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 292: L1304-L1312.

140. Enyeart JJ, Xu L, Danthi S, Enyeart JA. (2002) An ACTH- and ATP-regulated background K^+ channel in adrenocortical cells is TREK-1. J Biol Chem, 277: 49186-49199.

141. Zhang H, Shepherd N, Creazzo TL. (2008) Temperature-sensitive TREK currents contribute to setting the resting membrane potential in embryonic atrial myocytes. J Physiol, 586: 3645-3656.

142. Buxton ILO, Singer CA, Tichenor JN. (2010) Expression of Stretch-Activated Two-Pore Potassium Channels in Human Myometrium in Pregnancy and Labor. PLoS ONE, 5: e12372.

143. Kim Y, Bang H, Gnatenco C, Kim D. (2001) Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K^+ channels by pressure, free fatty acids and alkali. Pflugers Arch, 442: 64-72.

144. Lauritzen I, Chemin J, Honore E, Jodar M, Guy N, Lazdunski M, Jane PA. (2005) Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. EMBO Rep, 6: 642-648.

145. Danthi S, Enyeart JA, Enyeart JJ. (2003) Modulation of native TREK-1 and Kv1.4 K^+ channels by polyunsaturated fatty acids and lysophospholipids. J Membr Biol, 195: 147-164.

146. Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. (2000) Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. EMBO J, 19: 1784-1793.

147. Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M, Honore E. (2005) A phospholipid sensor controls mechanogating of the K^+ channel TREK-1. EMBO J, 24: 44-53.

148. Chemin J, Patel A, Duprat F, Zanzouri M, Lazdunski M, Honore E. (2005) Lysophosphatidic acid-operated K^+ channels. J Biol Chem, 280: 4415-4421.

149. Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Sachs F, Lazdunski M, Honore E. (2007) Up- and down-regulation of the mechano-gated K_{2P} channel TREK-1 by PIP_2 and other membrane phospholipids. Pflugers Arch, 455: 97-103.

150. Lopes CM, Rohacs T, Czirjak G, Balla T, Enyedi P, Logothetis DE. (2005) PIP_2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K^+ channels. J Physiol, 564: 117-129.

151. Sandoz G, Bell SC, Isacoff EY. (2011) Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108: 2605-2610.

152. Cohen A, Ben Abu Y, Hen S, Zilberberg N. (2008) A novel mechanism for human K_{2P}2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. J Biol Chem, 283: 19448-19455.

153. Sandoz G, Douguet D, Chatelain F, Lazdunski M, Lesage F. (2009) Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 14628-14633.

154. Bagriantsev SN, Peyronnet R, Clark KA, Honore E, Minor DL Jr. (2011) Multiple modalities converge on a common gate to control K_{2P} channel function. EMBO J, 30: 3594-3606.

155. Cain SM, Meadows HJ, Dunlop J, Bushell TJ. (2008) mGlu4 potentiation of $K_{2P}2.1$ is dependant on C-terminal dephosphorylation. Mol Cell Neurosci, 37: 32-39.

156. Kreneisz O, Benoit JP, Bayliss DA, Mulkey DK. (2009) AMP-activated protein kinase inhibits TREK channels. J Physiol, 587: 5819-5830.

157. Sandoz G, Thummler S, Duprat F, Feliciangeli S, Vinh J, Escoubas P, Guy N, Lazdunski M, Lesage F. (2006) AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K^+ channels into open leak channels. EMBO J, 25: 5864-5872.

158. Sandoz G, Tardy MP, Thummler S, Feliciangeli S, Lazdunski M, Lesage F. (2008) Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K^+ channel expression and trafficking. J Neurosci, 28: 8545-8552.

159. Deng PY, Xiao Z, Yang C, Rojanathammanee L, Grisanti L, Watt J, Geiger JD, Liu R, Porter JE, Lei S. (2009) GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2 K^+ channels. Neuron, 63: 230-243.

160. Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. (2002) Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. Neuroscience, 109: 231-241.

161. Yehuda S, Carasso RL, Mostofsky DI. (1994) Essential fatty acid preparation (SR-3) raises the seizure threshold in rats. Eur J Pharmacol, 254: 193-198.

162. Vreugdenhil M, Bruehl C, Voskuyl RA, Kang JX, Leaf A, Wadman WJ. (1996) Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 12559-12563.

163. Fraser DD, Hoehn K, Weiss S, MacVicar BA. (1993) Arachidonic acid inhibits sodium currents and synaptic transmission in cultured striatal neurons. Neuron, 11: 633-644.

164. Xiao Y, Li X. (1999) Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. Brain Res, 846: 112-121.

165. Garry A, Fromy B, Blondeau N, Henrion D, Brau F, Gounon P, Guy N, Heurteaux C, Lazdunski M, Saumet JL. (2007) Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. EMBO Rep, 8: 354-359.

166. Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH. (2004) Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. Br J Pharmacol, 142: 192-202.

167. Terrenoire C, Lauritzen I, Lesage F, Romey G, Lazdunski M. (2001) A TREK-1-like potassium channel in atrial cells inhibited by beta-adrenergic stimulation and activated by volatile anesthetics. Circ Res, 89: 336-342.

168. Aimond F, Rauzier JM, Bony C, Vassort G. (2000) Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K^+ current I_{TREK} in cardiomyocytes. J Biol Chem, 275: 39110-39116.

169. Xiao YF, Sigg DC, Ujhelyi MR, Wilhelm JJ, Richardson ES, Iaizzo PA. (2008) Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a nove. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 294: H2212-H2218.

170. Koh SD, Monaghan K, Sergeant GP, Ro S, Walker RL, Sanders KM, Horowitz B. (2001) TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. J Biol Chem, 276: 44338-44346.

171. Koh SD, Sanders KM. (2001) Stretch-dependent potassium channels in murine colonic smooth muscle cells. J Physiol, 533: 155-163.

172. Brenner T, O'Shaughnessy KM. (2008) Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. Am J Physiol Endocrinol Metab, 295: E1480-E1486.

173. Bandulik S, Tauber P, Lalli E, Barhanin J, Warth R. (2014) Two-pore domain potassium channels in the adrenal cortex. Pflugers Arch, 467: 1027-1042.

174. Enyeart JA, Danthi SJ, Enyeart JJ. (2004) TREK-1 K^+ channels couple angiotensin II receptors to membrane depolarization and aldosterone secretion in bovine adrenal glomerulosa cells. Am J Physiol Endocrinol Metab, 287: E1154-E1165.

175. Czirjak G, Enyedi P. (2002) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. Mol Endocrinol, 16: 621-629.

176. Franks NP, Lieb WR. (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. Nature, 367: 607-614.

177. Westphalen RI, Krivitski M, Amarosa A, Guy N, Hemmings HC Jr. (2007) Reduced inhibition of cortical glutamate and GABA release by halothane in mice lacking the K^+ channel, TREK-1. Br J Pharmacol, 152: 939-945.

178. Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL, Mathie A. (2005) Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. British Journal of Pharmacology, 144: 821-829.

179. Thummler S, Duprat F, Lazdunski M. (2007) Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. Biochem Biophys Res Commun, 354: 284-289.

180. Tsai SJ. (2008) Sipatrigine could have therapeutic potential for major depression and bipolar depression through antagonism of the two-pore-domain K^+ channel TREK-1. Med Hypotheses, 70: 548-550.

181. Matenia D, Mandelkow EM. (2009) The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. Trends Biochem Sci, 34: 332-342.

182. Shelly M, Poo MM. (2011) Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization. Dev Neurobiol, 71: 508-527.

183. Reiner O, Sapir T. (2014) Mark/Par-1 marking the polarity of migrating neurons. Adv Exp Med Biol, 800: 97-111.

184. McDonald JA. (2014) Canonical and noncanonical roles of Par-1/MARK kinases in cell migration. Int Rev Cell Mol Biol, 312: 169-199.

185. Hayashi K, Suzuki A, Ohno S. (2012) PAR-1/MARK: a kinase essential for maintaining the dynamic state of microtubules. Cell Struct Funct, 37: 21-25.

186. Drewes G, Ebneth A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. Cell, 89: 297-308.

187. Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS. (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C. elegans embryos. Cell, 52: 311-320.

188. Guo S, Kemphues KJ. (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell, 81: 611-620.

189. Timm T, Li XY, Biernat J, Jiao J, Mandelkow E, Vandekerckhove J, Mandelkow EM. (2003) MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1. EMBO J, 22: 5090-5101.

190. Timm T, Marx A, Panneerselvam S, Mandelkow E, Mandelkow EM. (2008) Structure and regulation of MARK, a kinase involved in abnormal phosphorylation of Tau protein. BMC Neurosci, 9 (Suppl 2): S9 (1-6).

191. Lizcano JM, Goransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Makela TP, Hardie DG, Alessi DR. (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. EMBO J, 23: 833-843.

192. Marx A, Nugoor C, Muller J, Panneerselvam S, Timm T, Bilang M, Mylonas E, Svergun DI, Mandelkow EM, Mandelkow E. (2006) Structural variations in the catalytic and ubiquitin-associated domains of microtubule-associated protein/microtubule affinity regulating kinase MARK1 and MARK2. J Biol Chem, 281: 27586-27599.

193. Panneerselvam S, Marx A, Mandelkow EM, Mandelkow E. (2006) Structure of the catalytic and ubiquitin-associated domains of the protein kinase MARK/Par-1. Structure, 14: 173-183.

194. Uboha NV, Flajolet M, Nairn AC, Picciotto MR. (2007) A calcium- and calmodulin-dependent kinase Ialpha/microtubule affinity regulating kinase 2 signaling cascade mediates calcium-dependent neurite outgrowth. J Neurosci, 27: 4413-4423.

195. Timm T, Balusamy K, Li X, Biernat J, Mandelkow E, Mandelkow EM. (2008) Glycogen synthase kinase (GSK) 3beta directly phosphorylates Serine 212 in the regulatory loop and inhibits microtubule affinity-regulating kinase (MARK) 2. J Biol Chem, 283: 18873-18882.

196. Hurov JB, Watkins JL, Piwnica-Worms H. (2004) Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. Curr Biol, 14: 736-741.

197. Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, Maniwa R, Yamanaka T, Mizuno K, Kishikawa M, Hirose H, Amano Y, Izumi N, Miwa Y, Ohno S. (2004) aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. Curr Biol, 14: 1425-1435.

198. Watkins JL, Lewandowski KT, Meek SE, Storz P, Toker A, Piwnica-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.

199. Moravcevic K, Mendrola JM, Schmitz KR, Wang YH, Slochower D, Janmey PA, Lemmon MA. (2010) Kinase associated-1 domains drive MARK/PAR1 kinases to membrane targets by binding acidic phospholipids. Cell, 143: 966-977.

200. Zhu W, Oxford GS. (2011) Differential gene expression of neonatal and adult DRG neurons correlates with the differential sensitization of TRPV1 responses to nerve growth factor. Neurosci Lett, 500: 192-196.

201. Ernsberger U. (2009) Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. Cell Tissue Res, 336: 349-384.

202. Huang CW, Hung TY, Liao YK, Hsu MC, Wu SN. (2013) Underlying mechanism of regulatory actions of diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent, on neuronal potassium channels and firing: an experimental and theoretical study. J Physiol Pharmacol, 64: 269-280.

203. Moldovan M, Alvarez S, Romer RM, Krarup C. (2013) Axonal voltage-gated ion channels as pharmacological targets for pain. Eur J Pharmacol, 708: 105-112.

204. Ritter DM, Zemel BM, Hala TJ, O'Leary ME, Lepore AC, Covarrubias M. (2015) Dysregulation of Kv3.4 channels in dorsal root Ganglia following spinal cord injury. J Neurosci, 35: 1260-1273.

205. Zhang XL, Mok LP, Katz EJ, Gold MS. (2010) BKCa currents are enriched in a subpopulation of adult rat cutaneous nociceptive dorsal root ganglion neurons. Eur J Neurosci, 31: 450-462.

206. Cao XH, Chen SR, Li L, Pan HL. (2012) Nerve injury increases brain-derived neurotrophic factor levels to suppress BK channel activity in primary sensory neurons. J Neurochem, 121: 944-953.

207. Wu Y, Liu Y, Hou P, Yan Z, Kong W, Liu B, Li X, Yao J, Zhang Y, Qin F, Ding J. (2013) TRPV1 channels are functionally coupled with BK(mSlo1) channels in rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. PLoS One, 8: e78203.

208. Boettger MK, Till S, Chen MX, Anand U, Otto WR, Plumpton C, Trezise DJ, Tate SN, Bountra C, Coward K, Birch R, Anand P. (2002) Calcium-activated potassium channel SK1- and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors. Brain, 125: 252-263.

209. Mongan LC, Hill MJ, Chen MX, Tate SN, Collins SD, Buckby L, Grubb BD. (2005) The distribution of small and intermediate conductance calcium-activated potassium channels in the rat sensory nervous system. Neuroscience, 131: 161-175.

210. Kawano T, Zoga V, McCallum JB, Wu HE, Gemes G, Liang MY, Abram S, Kwok WM, Hogan QH, Sarantopoulos CD. (2009) ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. Neuroscience, 162: 431-443.

211. Du X, Wang C, Zhang H. (2011) Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. Mol Pain, 7: 35.

212. Marsh B, Acosta C, Djouhri L, Lawson SN. (2012) Leak K^+ channel mRNAs in dorsal root ganglia: Relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. Mol Cell Neurosci, 49: 375-386.

213. Morenilla-Palao C, Luis E, Fernandez-Pena C, Quintero E, Weaver JL, Bayliss DA, Viana F. (2014) Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation. Cell Rep, 8: 1571-1582.

214. Luft JH. (1971) Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat Rec, 171: 347-368.

215. Moore CL. (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. Biochem Biophys Res Commun, 42: 298-305.

216. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. Nature, 476: 341-345.

217. Shoshan-Barmatz V, Gincel D. (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. Cell Biochem Biophys, 39: 279-292.

218. Israelson A, Zaid H, Abu-Hamad S, Nahon E, Shoshan-Barmatz V. (2008) Mapping the ruthenium red-binding site of the voltage-dependent anion channel-1. Cell Calcium, 43: 196-204.

219. Volpe P, Salviati G, Chu A. (1986) Calcium-gated calcium channels in sarcoplasmic reticulum of rabbit skinned skeletal muscle fibers. J Gen Physiol, 87: 289-303.

220. Vale MG, Carvalho AP. (1973) Effects of ruthenium red on Ca^{2+} uptake and ATPase of sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. Biochim Biophys Acta, 325: 29-37.

221. Missiaen L, De SH, Droogmans G, Wuytack F, Raeymaekers L, Casteels R. (1990) Ruthenium red and compound 48/80 inhibit the smooth-muscle plasma-membrane Ca^{2+} pump via interaction with associated polyphosphoinositides. Biochim Biophys Acta, 1023: 449-454.

222. Cibulsky SM, Sather WA. (1999) Block by ruthenium red of cloned neuronal voltage-gated calcium channels. J Pharmacol Exp Ther, 289: 1447-1453.

223. Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A. (2000) Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. J Biol Chem, 275: 32552-32558.

224. Hoenderop JG, Vennekens R, Muller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ, Nilius B. (2001) Function and expression of the epithelial Ca^{2+} channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. J Physiol, 537: 747-761.

225. Charuk JH, Pirraglia CA, Reithmeier RA. (1990) Interaction of ruthenium red with Ca^{2+}-binding proteins. Anal Biochem, 188: 123-131.

226. Wann KT, Richards CD. (1994) Properties of single calcium-activated potassium channels of large conductance in rat hippocampal neurons in culture. Eur J Neurosci, 6: 607-617.

227. Wu SN, Jan CR, Li HF. (1999) Ruthenium red-mediated inhibition of large-conductance Ca^{2+}-activated K^{+} channels in rat pituitary GH3 cells. J Pharmacol Exp Ther, 290: 998-1005.

228. Szabadkai G, Varnai P, Enyedi P. (1999) Selective inhibition of potassium-stimulated rat adrenal glomerulosa cells by ruthenium red. Biochem Pharmacol, 57: 209-218.

229. Czirjak G, Enyedi P. (2003) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. Mol Pharmacol, 63: 646-652.

230. Hall JP, Griffith WP. (1980) Studies on transition-metal nitrido- and oxo-complexes. Part 6. Nitrido-bridged complexes of osmium and ruthenium . J Chem Soc , Dalton Trans, 12: 2410-2414.

231. Schachter JB, Sromek SM, Nicholas RA, Harden TK. (1997) HEK293 human embryonic kidney cells endogenously express the $P2Y_1$ and $P2Y_2$ receptors. Neuropharmacology, 36: 1181-1187.

232. Luo J, Busillo JM, Benovic JL. (2008) M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. Mol Pharmacol, 74: 338-347.

233. Mirkovic K, Wickman K. (2011) Identification and characterization of alternative splice variants of the mouse Trek2/Kcnk10 gene. Neuroscience, 194: 11-18.

234. Pereira V, Busserolles J, Christin M, Devilliers M, Poupon L, Legha W, Alloui A, Aissouni Y, Bourinet E, Lesage F, Eschalier A, Lazdunski M, Noel J. (2014) Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. Pain, 155: 2534-2544.

235. Lauritzen I, Zanzouri M, Honore E, Duprat F, Ehrengruber MU, Lazdunski M, Patel AJ. (2003) K^+-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K^+ channels. J Biol Chem, 278: 32068-32076.

236. Larkman PM, Perkins EM. (2005) A TASK-like pH- and amine-sensitive 'leak' K^+ conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro. Eur J Neurosci, 21: 679-691.

237. Aller MI, Veale EL, Linden AM, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W, Brickley SG. (2005) Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. Journal of Neuroscience, 25: 11455-11467.

238. Musset B, Meuth SG, Liu GX, Derst C, Wegner S, Pape HC, Budde T, Preisig-Muller R, Daut J. (2006) Effects of divalent cations and spermine on the K^+ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. J Physiol, 572: 639-657.

239. Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H. (2006) Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. Circ Res, 98: 1072-1080.

240. Putzke C, Wemhoner K, Sachse FB, Rinne S, Schlichthorl G, Li XT, Jae L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Muller R, Daut J, Decher N. (2007) The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. Cardiovasc Res, 75: 59-68.

241. Deng PY, Lei SB. (2008) Serotonin increases GABA release in rat entorhinal cortex by inhibiting interneuron TASK-3 K^+ channels. Molecular and Cellular Neuroscience, 39: 273-284.

242. Weber M, Schmitt A, Wischmeyer E, Doring F. (2008) Excitability of pontine startle processing neurones is regulated by the two-pore-domain K^+ channel TASK-3 coupled to 5-HT2C receptors. Eur J Neurosci, 28: 931-940.

243. Ernest NJ, Logsdon NJ, McFerrin MB, Sontheimer H, Spiller SE. (2010) Biophysical properties of human medulloblastoma cells. J Membr Biol, 237: 59-69.

244. Chen YM, Wang QJ, Hu HS, Yu PC, Zhu J, Drewes G, Piwnica-Worms H, Luo ZG. (2006) Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity. Proc Natl Acad Sci U S A, 103: 8534-8539.

245. Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM. (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. Mol Biol Cell, 13: 4013-4028.

246. Terabayashi T, Itoh TJ, Yamaguchi H, Yoshimura Y, Funato Y, Ohno S, Miki H. (2007) Polarity-regulating kinase partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinase 2 negatively regulates development of dendrites on hippocampal neurons. J Neurosci, 27: 13098-13107.

247. Sapir T, Shmueli A, Levy T, Timm T, Elbaum M, Mandelkow EM, Reiner O. (2008) Antagonistic effects of doublecortin and MARK2/Par-1 in the developing cerebral cortex. J Neurosci, 28: 13008-13013.

248. Barnes AP, Polleux F. (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. Annu Rev Neurosci, 32: 347-381.

249. Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, Metalnikov P, O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, Zougman A, Woodgett JR, Langeberg LK, Scott JD, Pawson T. (2004) Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. Curr Biol, 14: 1436-1450.

250. Angrand PO, Segura I, Volkel P, Ghidelli S, Terry R, Brajenovic M, Vintersten K, Klein R, Superti-Furga G, Drewes G, Kuster B, Bouwmeester T, Acker-Palmer A. (2006) Transgenic mouse proteomics identifies new 14-3-3-associated proteins involved in cytoskeletal rearrangements and cell signaling. Mol Cell Proteomics, 5: 2211-2227.

251. Gumy LF, Yeo GS, Tung YC, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BY, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW. (2011) Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. RNA, 17: 85-98.

252. Trinczek B, Brajenovic M, Ebneth A, Drewes G. (2004) MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes. J Biol Chem, 279: 5915-5923.

253. Bohm H, Brinkmann V, Drab M, Henske A, Kurzchalia TV. (1997) Mammalian homologues of C. elegans PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. Curr Biol, 7: 603-606.

254. Dai S, Hall DD, Hell JW. (2009) Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. Physiol Rev, 89: 411-452.

255. Yaffe E, Fishelovitch D, Wolfson HJ, Halperin D, Nussinov R. (2008) MolAxis: a server for identification of channels in macromolecules. Nucleic Acids Res, 36: W210-W215.

256. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph, 14: 33-38.

257. Gonzalez W, Zuniga L, Cid LP, Arevalo B, Niemeyer MI, Sepulveda FV. (2013) An extracellular ion pathway plays a central role in the cooperative gating of a K_{2P} K^+ channel by extracellular pH. J Biol Chem, 288: 5984-5991.

258. Acosta C, Djouhri L, Watkins R, Berry C, Bromage K, Lawson SN. (2014) TREK2 expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous pain. J Neurosci, 34: 1494-1509.

12. Saját publikációk jegyzéke

A tézisek alapjául szolgáló közlemények, melyekre zárójelben az alábbiakban feltüntetett római számokkal hivatkoztam az értekezésben:

I. **Braun G**, Nemcsics B, Enyedi P, Czirják G. (2011) TRESK background K^+ channel is inhibited by PAR-1/MARK microtubule affinity-regulating kinases in Xenopus oocytes. *PLoS One,* 6: e28119.
IF: 4,092

II. **Braun G**, Lengyel M, Enyedi P, 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.
IF: ~4,842 (2014)

Egyéb közlemények:

III. Enyedi P, **Braun G**, Czirják G. (2012) TRESK: The lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol Cell Endocrinol,* 353: 75-81. Review.
IF: 4,039

IV. Enyedi P, Veres I, **Braun G**, Czirják G. (2014) Tubulin binds to the cytoplasmic loop of TRESK background K^+ channel in vitro. *PLos One,* 9: e97854.
IF: 3,234

13. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, dr. Czirják Gábornak tartozom köszönettel folyamatos szakmai útmutatásáért és segítségéért, illetve türelméért, támogatásáért. Köszönöm dr. Enyedi Péter professzor úrnak a munkámhoz elengedhetetlenül szükséges feltételek biztosítását, szakmai iránymutatását, valamint hogy laboratóriumában dolgozhattam. Dr. Benyó Zoltán professzor úrnak külön hálával tartozom, amiért javaslatával Enyedi professzor munkacsoportjába kerülhettem.

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 az Enyedi labor minden jelenlegi és volt munkatársának, így különös köszönet illeti Veres Irén, Dobolyi G. Alice és Busi Beáta asszisztensnőket lelkes és sokszor önfeláldozó segítségükért, továbbá dr. Lengyel Miklós, dr. Nemcsics Balázs és dr. Kovács Attila TDK hallgatókat, akik értékes javaslataikkal és nem egyszer munkájukkal járultak hozzá e disszertációban tárgyalt eredmények megszületéséhez. Külön köszönet illeti dr. Pethő Gábor docens urat, akinek önzetlen segítségére mindig számíthattam, továbbá dr. Hably Csillát, dr. Szekeres Máriát, dr. Káldi Krisztinát, dr. Balla Andrást, Ella Krisztinát, dr. Csépányi-Kömi Rolandot és Lőrincz Márton Ákost, akik az oktatással kapcsolatban felmerült kérdéseimre adtak szívélyes és pótolhatatlan válaszokat. Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Élettani Intézet és az EOK Állatház minden munkatársának.

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