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

Doktori tézisek

Dr. Braun Gabriella

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

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

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

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Benyó Zoltán egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Kékesi Violetta egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Szentesi Péter tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2015

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 (**T**WIK-**RE**lated **S**pinal cord **K**$^+$ channel) és a TREK-2 (**T**WIK-**RE**lated **K**$^+$ channel) csatornák jelentős mértékben fejeződnek ki, melyek közül a TRESK neuropátiás fájdalomban betöltött lehetséges szerepét több közlemény is taglalja.

A 2P K^+ csatornák nevüket onnan kapták, hogy alegységenként két pórusképző domént tartalmaznak, így dimerként működnek szemben a többi, tetramerként működőképes K^+ csatornával. A K_{2P} csatornák a membránpotenciál nyugalmi értéke körüli negatív feszültségtartományban is aktívak, emiatt képesek az ingerlékenységet meghatározni. Ezáltal, azaz az ingerlékenység csökkentésével, valamint a membránpotenciál szabályozásával

fontos szerepet töltenek be számos ingerlékeny és nem excitábilis sejttípusban is.

A többi háttér K^+ (K_{2P}) csatornához viszonyítva a TRESK szöveti lokalizációja sokkal specifikusabb, mRNS-e nagy mennyiségben a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok érzőneuronjaiban, illetve a vegetatív idegdúcok neuronjaiban található meg. A csatorna pontos szerepe még nem tisztázott, azonban feltehetően a krónikus fájdalom csökkentésén túl más folyamatokban is részt vesz. Ugyanis a közelmúltban a TRESK domináns negatív mutációját figyelték meg egy nagy családban halmozottan előforduló, aurával járó migrénes megbetegedések során.

Munkacsoportunk írta le a TRESK áram kalciumfüggő, kalcineurin általi többszörös aktivációját *Xenopus* heterológ expressziós rendszerben. A békapetesejtben expresszált TRESK áram aktivációja során a kalcineurin defoszforilálja a csatorna intracelluláris hurok régiójának bizonyos szerin oldalláncait, melyek az egér csatornában a 264-es, valamint az aktivációban elsődleges funkcióval rendelkező három közeli, 274-es, 276-os és 279-es szerineknek (az ún. Ser 276-os clusternek) felelnek meg. Habár néhány munkacsoportnak sikerült emlős sejtvonalban is aktiválni a TRESK-áramot, az áramnövekedés jóval alulmaradt a *Xenopus* petesejt rendszerben megfigyelthez képest, és a kalcineurin szerepe is tisztázásra várt.

Xenopus petén a jelentős, öt-, tízszeres mértékű aktivációt követően a TRESK áram lassan kezd visszatérni a kezdeti,

stimulációt megelőző szintre, tehát az aktiváció során defoszforilálódó szerineket feltehetően kinázok képesek újra foszforilálni, és ezzel a stimulált állapotot megszüntetni, a TRESK áramot gátolni. Kutatócsoportunk kimutatta, hogy az áram visszaállásában jelentős szerepű Ser 276-os clustert refoszforiláló ismeretlen kináz hatását a 14-3-3 adapter fehérje gátolja, függetlenül attól, hogy a 14-3-3 közvetlenül is kötődik a TRESK-hez. A szabályozásban mérsékeltebb fontosságú szerint a PKA foszforilálja.

A háttér K^+ áramok tekintetében vizsgált ingerlékeny sejtek jelentős része, köztük a hátsó gyöki ganglion idegsejt vagy például a kisagyi szemcsesejt többféle K_{2P} csatornát is kifejez. Azonban az egyes K_{2P} csatornák pontos működésének és szerepének tisztázáshoz az egy sejttípusban teljes sejt patch clamp mérésekben kimutatható háttér K^+ áramok megkülönböztetésére lenne szükség. Ehhez pedig még alig állnak rendelkezésünkre specifikus K_{2P} csatorna gátló- vagy aktiválószerek, így a K_{2P} csatornák árama nem, vagy csak nehezen különíthető el. Munkacsoportunk korábbi eredménye alapján a polikationos ruténiumvöröst mára széles körben alkalmazzák a közeli rokon TASK-1 és TASK-3 csatornák áramának elkülönítésére natív sejtekben. Annak ellenére, hogy a ruténiumvörös nem specifikus gátlószere a TASK-3 csatornának, hiszen számos egyéb csatornára is hat, a két közeli rokon TASK csatorna áramát sikeresen elkülönítették segítségével motoneuronokban, kisagyi szemcsesejtekben, glomus caroticum kemoreceptor sejtjeiben és számos egyéb sejttípusban. Ez alapján felmerült a kérdés, hogy vajon a ruténiumvörös a többi K_{2P} csatorna áramát képes-e befolyásolni.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A DRG és TRG neuronok egyik legjelentősebb háttér K^+ áramát biztosító TRESK csatorna kalcineurin általi nagyfokú aktivációjának vizsgálata emlős sejtekben, HEK293 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 polikation ruténiumvörös (RR) hogyan hat az egyes – *Xenopus* petesejtben kifejezett – K_{2P} csatorna áramokra, vagyis milyen csatornák farmakológiai elkülönítésére használható.

4. Amennyiben a már ismerteken kívül létezik RR-érzékeny K_{2P} csatorna, terveztük a hatásmechanizmus feltárását, a dózis-hatás görbe meghatározását, valamint a lehetőségekhez mérten a festék hatásának kimutatását natív sejtben expresszálódó csatornán.

MÓDSZEREK

Petesejtek preparálása, injektálása

Xenopus laevis békából petesejteket izoláltunk, majd másnap az expresszálni kívánt cRNS-t injektáltuk. A méréseket 2-4 nappal az injektálás után végeztük.

Felnőtt egér DRG disszociált neuronkultúra előállítása

40-70 napos NMRI egereket CO_2 belélegeztetésével túlaltattunk, majd spinális ganglionjaikat 37 °C-on kollagenázzal emésztettük. Az idegdúcokat antibiotikumot és 10% FBS-t tartalmazó DMEM/F12 (1:1) tápfolyadékban mechanikusan disszociáltuk, és az így keletkezett sejtszuszpenziót (neuronok és gliasejtek) ismételt centrifugálással tisztítottuk, majd poli-L-lizinnel kezelt sejttenyésztő edényekbe osztottuk, és 37 °C-on 5% CO_2 légterű termosztátban tároltuk. A méréseket a sejtek letapadása után, a preparálástól számított 72 órán belül végeztük.

HEK293 sejttenyészet, tranziens transzfekció

A HEK293 sejtvonalat antibiotikumot és 10% FBS-t tartalmazó DMEM tápfolyadékban tartottuk fenn. A TRESK csatorna DNS-ét tartalmazó pIRES-CD8 plazmid transzfektálása (Lipofectamin 2000) után a méréseket 36-72 óra múlva végeztük.

Két-elektródos voltage clamp mérések

A *Xenopus* petesejtek membránján folyó áramot két-elektródos feszültségzár (voltage clamp) módszerrel mértük OC-725C erősítő segítségével. A perfúziós rendszerrel folyamatosan cserélt extracelluláris (EC) oldat 2 vagy 80 mM [K^+]-t tartalmazott, melyekben a [K^+] és [Na^+] összege állandó volt. Az intracelluláris (IC) boroszilikát üveg mikroelektródokat (0,3-1 MΩ) 3 M KCl-dal töltöttük meg. A mérési adatokat analóg-digitális átalakítón juttattuk számítógépre és pClamp 10.1 szoftver segítségével regisztráltuk és értékeltük ki. A befelé irányuló háttér K^+ áramot a magas [K^+]-jú oldatban szobahőmérsékleten (21 °C) mértük egy ismétlődő, 300 ms hosszú -100 mV-os feszültséglépés végén, melyből az ugyanezen paraméterek mellett, de alacsony [K^+]-jú oldatban mért értéket kivontuk.

Patch clamp mérések

A HEK293 sejteken és DRG neuronokon a patch clamp méréseket teljes sejt (whole-cell) feszültségzár módban végeztük. A boroszilikát üvegből húzott mérőpipetta (3-9 MΩ) az Axopatch-1D patch-clamp erősítőhöz csatlakozott. Az EC oldat 2 vagy 30 mM [K^+]-t tartalmazott, melyekben a [K^+] és [Na^+] összege állandó volt. A K^+ áram mérésének elve, és az adatok analizálása megegyezett a két-elektródos feszültségzár méréseknél alkalmazottal. A HEK293 sejtvonal letapadt, különálló sejtjein ~ 21 °C-on mértük a TRESK áramot. Az ionomycinnel történő ingerlés előtt kalciummentes, a kezelés során Ca^{2+}-ot (2 mM) tartalmazó EC oldatokat alkalmaztunk.

A DRG neuronokat 37 °C-on Ca^{2+}-os EC közegben mértük, a többi fontosabb paraméter az előzőekkel megegyezett.

Plazmidok és cRNS

A megfelelő fehérjét kódoló cDNS-t a pXEN *Xenopus* petesejt expressziós vektorba klónoztuk. A cRNS in vitro előállításához az mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription „kit”-et használtuk. A termékeket denaturáló agarózgélen ellenőriztük.

A protein kináz (pl. MARK2) és a tau cDNS-eket különböző egér szövetek teljes RNS-éből reverz transzkripciót követő PCR segítségével sokszorosítottuk, majd a pXEN vektorba klónozott termékeket szekvenálással ellenőriztettük. A mutáns konstrukciókat a *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* felhasználásával állítottuk elő.

Rekombináns fúziós fehérjék előállítása

A TRESK-hurok fúziós fehérjék, a tau és a MARK2 kináz kódoló régióit különböző pGEX és pET plazmidokba szubklónoztuk, és ezek GST- vagy tioredoxin-hexahisztidin (Trx-His_6)-címkével ellátott változatát *E. coli*-ban (BL21) termeltettük meg. A fúziós fehérjéket glutation- (GST) vagy Ni-NTA (Trx-His_6) agarózon tisztítottuk. A GST-s konstrukciókat redukált glutationnal, a Trx-His_6 címkés fehérjéket 300 mM imidazollal kiegészített oldatban eluáltuk.

In vitro radioaktív foszforiláció

A glutation- vagy Ni-NTA gyantán megkötött TRESK hurok fúziós fehérjéket a megfelelő konstitutívan aktív (T208E) MARK2 preparátumok segítségével 30 °C-on 1 órán át, folyamatos keverés mellett foszforiláltattuk 20 μM ATP és 50-100 kBq ^{32}P-γ-ATP jelenlétében. A foszforiláció létrejöttét a radioaktív ^{32}P beépülése alapján GS-525 PhosphorImager készülékkel kvantitatívan határoztuk meg.

A ruténiumibolya (RV) tisztítása

Az RV tisztítása egy "régi" (1996-ban gyártott) ruténiumvörös preparátumból történt ioncserélő kromatográfiával karboximetil-cellulóz gyantán. Az RR-t és RV-t is tartalmazó preparátumot 10 mM-os ammónium-acetátban (AA) vittük fel a gyantára, melyről először az RR-t eluáltuk, az RV-t lineáris grádiens elúcióval (50 mM–1,5 M AA) nyertük. A grádiens egyes frakcióiban az RV tisztaságát fotometriás spektrum alapján határoztuk meg. A legtisztább RV frakciókat liofilizáltuk, majd AA-ban oldottuk fel.

Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag ± az átlag hibája formájában adtuk meg. A különbségeket $p<0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak, kiértékelésüket a STATISTICA, a görbeillesztést és korrelációanalízist az ORIGIN programok segítségével végeztük. A Student-féle kétmintás t-próba mellett néhány esetben egyszempontos variancia-analízist Tukey HSD vagy Scheffe post hoc teszttel, valamint Pearson produkt-momentum korrelációanalízist használtunk. A dózis-hatás görbéket módosított Hill egyenlet alapján illesztettük. Az elemszám minden csoportban legalább 5.

EREDMÉNYEK

A DRG neuronok egyik legjelentősebb háttér K^+ csatornája – a TRESK – emlős sejtvonalban kifejezve az irodalmi adatok szerint csak kismértékben (20-80 %) aktiválódott a citoplazma kalcium koncentráció megemelésének hatására. Munkám során beállítottam egy olyan teljes-sejt patch clamp mérési eljárást, melynek alkalmazásával sikerült a *Xenopus* rendszerben szokásoshoz hasonló mértékben 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 többszörös (akár több mint hatszoros) 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 cyclosporin 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 TRESK csatornák esetén.

Munkacsoportunk megfigyelése, mely szerint Xenopus petesejtben a 14-3-3 gátolja a keresett kináz TRESK áramra kifejtett hatását, az AMPK rokon protein kinázok közé tartozó MARK kinázok megtalálásához vezetett.

Mivel a MARK kinázok a sejtpolaritás széles körben elterjedt regulátorai, így elképzelhető, hogy a TRESK csatornát expresszáló sejtekben is jelen vannak. A négy MARK kináz közül a MARK1, 2 és 3 elősegíti az aktivált TRESK áram nyugalmi szintre történő visszaállását, vagyis a csatorna aktivált állapotának megszűnését, míg a MARK4 egyáltalán nem hat az áramra. A többi, általunk vizsgált AMPK rokon kináz nem gyorsította a TRESK visszaállást.

A továbbiakban csak a MARK2 2-es izoformáját vizsgáltuk, de ezt röviden csak MARK2-ként jelöltük. Igazoltuk, hogy a MARK2 kináz nemcsak az aktivált humán és egér TRESK áram visszaállását gyorsítja, hanem a nyugalmi áramot is gátolja. A hatásban nem volt különbség akkor sem, ha a TRESK aktiválását nem ionomycinnel, hanem receptoriális úton váltottuk ki. Konstitutívan aktív vagy kináz inaktív MARK2 mutánsokat együtt kifejezve a TRESK csatornával bizonyítottuk, hogy a hatáshoz a kináz enzimaktivitása nélkülözhetetlen. Kimutattuk, hogy *Xenopus* rendszerben a MARK2 akkor is felgyorsítja a TRESK áram visszaállását annak kalciumfüggő aktivációját követően, ha a Ser 264, az egér TRESK aktiváció egyik, bár kétségkívül kevésbé jelentős meghatározója, és egyben 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.

Konstitutívan aktív, *E. coli* baktériumokban termeltetett rekombináns MARK2 fehérjével mikroinjektált sejtekben is

felgyorsult az aktivációt követő visszaállás, mely 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.

In vitro radioaktív foszforilációval kimutattuk, hogy a MARK2 foszforilálja a TRESK csatorna intracelluláris hurok régióját, azon belül is a Ser274/276/279 cluster szerinjeit, amelyek a csatorna-aktivitás fő meghatározói, míg a 264-es szerin nem foszforilálódott.

Disszertációm második felében a polikationos ruténiumvörös (RR) különböző háttér K^+ csatornákra kifejtett hatását vizsgáltam. A festék a TREK-2 áram igen potens (IC_{50}=0,23 μM) és gyors kinetikával jellemezhető inhibitora, míg a közeli rokon TREK-1 áramra teljesen hatástalan. Az RR − TREK-2 dózis-hatás összefüggéséből módosított Hill egyenlet alapján számolt 1,2 körüli Hill koefficiens azt sugallja, hogy egy ruténiumvörös molekula kapcsolódik a TREK-2 alegységek dimeréhez. A többszörösen pozitív töltésű ruténiumvörössel történő interakcióban elsősorban negatív töltésű aminosavak jöhetnek szóba, valamint a hisztidin deprotonált állapotában, elektronegatív nitrogén atomja miatt. Ezért a ruténiumvörös hatásmechanizmusának elemzésére a TREK-2 első extracelluláris régióinak azon negatív töltésű aminosavait és hisztidinjeit vizsgáltuk, melyekkel homológ pozícióban a ruténiumvörösre rezisztens TREK-1 nem negatív töltésű vagy hisztidintől eltérő aminosavakat tartalmaz.

A TREK-2 így kiválasztott negatív töltésű, valamint hisztidin aminosavait a TREK-1 megfelelő aminosavaira mutáltuk. Ezek mindegyike az első extracelluláris hurkon (az ún. *cap* doménban) helyezkedett el. Az egyik dupla mutáns TREK-2 csatorna (D133A-D135I) áramát a festék nem gátolta, ezért elkészítettük az ennek megfelelő két pontmutánst. A D135 mutációja önmagában is eliminálta a TREK-2 ruténiumvörös-érzékenységét, tehát a 135-ös helyzetű konzervált aszpartát tekinthető az RR-szenzitivitás közvetítőjének. A szóban forgó Asp (D) a TASK-3 RR szenzitivitásért felelős glutamát (E70) aminosavával homológ pozíciójú. Az azonosított aminosav fontosságát jól illusztrálja, hogy a TREK-1 homológ pozíciójú izoleucinjét aszpartátra mutálva a TREK-1 áram kifejezetten RR-érzékennyé válik. Tandem TREK-2 konstrukciókat állítottunk elő, melyekben a csatorna két alegységét egyetlen polipeptidlánc alkotja, és kimutattuk, hogyha 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 (extracellular ion pathway, 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 korábban szintén nagymértékben RR szenzitívnek bizonyuló TRAAK áramot az újabb, és tisztább RR preparátum kevésbé gátolta.

Bizonyítottuk, hogy a régi és az új RR készítmények közötti különbség oka részben a ruténiumibolya (RV), egy a kereskedelemben kapható RR preparátumokban előforduló szennyező komponens. Feltehetőleg az RR (IC_{50}=1,7 μM) és az RV (IC_{50}=0,11 μM) TRAAK áramra kifejtett hatásmechanizmusa is eltérő, melyre a jelentősen különböző Hill koefficiensekből (RR: 1,1; RV: 2,0) következtethetünk. Érdekes módon a hatás jellegét tekintve a többi, általunk megvizsgált K_{2P} csatorna esetén nem volt különbség az RR és az RV között.

Más kutatócsoportok elektrofiziológiai tulajdonságokat és mRNS tartalmat vizsgáló eredményei alapján a rágcsálók DRG idegsejtjeiben a háttér K^+ áramokat túlnyomórészt a TREK-2 és a TRESK, kisebb arányban a TREK-1 és a TRAAK csatornák biztosítják. Azt is leírták patch clamp kísérletekre alapozva, hogy patkány DRG neuronok háttér K^+ áramának két legfontosabb komponense 37 °C-on a TREK-2, és valamivel kisebb arányban a TRESK. Míg 24 °C-on mérve a TRESK dominált, és a TREK-2, valamint a TREK-1 és TRAAK áramok előfordulása elhanyagolható volt.

Felnőtt egér DRG neuronjain 37 °C-on, teljes sejt patch clamp módszerrel vizsgáltuk az RR-érzékeny TREK-2 áramot. Elsőként mértünk DRG neuronon RR-érzékeny háttér K^+ áramot. Számos idegsejten viszonylag kis K^+ áramot mértünk (<0,5 nA, 30 mM [K^+] EC oldatban, -100 mV-on), és ezt az RR jelentősen (60-80%) gátolta.

A nagy (>0,5 nA) háttér K^+ áramú DRG neuronokban az áram RR érzékenysége legtöbbször kisebb volt ennél. Az idegsejtek háttér K^+ árama és RR érzékenysége tehát negatív korrelációt mutatott, azaz a kisebb háttér K^+ áramú neuronokban nagyobb arányban fordult elő a RR szenzitív összetevő. Ez utóbbit valószínűleg legnagyobb arányban a TREK-2 árama adja, bár kisebb mértékben a TRAAK és a TASK-3 áramok is hozzájárulhatnak.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Emlős sejtvonalban (HEK293) a kalcium-függő TRESK aktiváció mértéke, megfelelő mérési körülmények között, megközelíti a *Xenopus* heterológ rendszerre jellemzőt. Emlős sejtvonalban is a kalcineurin hozza létre a TRESK áram jelentős mértékű aktivációját. Az aktiváció feltételezhetően a TRESK csatornát fiziológiásan kifejező sejttípusokban is e mechanizmus szerint megy végbe.

2. Kimutattuk, hogy az AMPK-rokon szerin/treonin kináz MARK2 *Xenopus* heterológ rendszerben gátolja a TRESK áramot, és in vitro foszforilálja a csatorna Ser 276-os clusterét. Ez természetesen nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a MARK in vivo nem vagy csak közvetve hat a TRESK áramra, egy vagy akár több ismeretlen „TRESK-szabályozó" fehérjét (is) foszforilálva, illetve az áramot más, a MARK-tól független kinázok (is) befolyásolják. Az is lehetséges, hogy a MARK2 kináz egyéb intracelluláris oldalláncokat is foszforilál a TRESK-ben. Mindenesetre kijelenthető, hogyha léteznek is ilyen aminosavak, akkor ezek csak kevéssé befolyásolják a csatorna aktivitását.

A TRESK–MARK kölcsönhatás a sejtpolaritás, a mikrotubulus dinamika, az idegi differenciáció, és a TRESK csatorna, ill. a rajta keresztülfolyó háttér K^+ áram szabályozása közötti összefüggés lehetőségét veti fel.

3. A TREK-2 áramot a ruténiumvörös igen gyorsan és hatékonyan gátolja, míg a közeli rokon TREK-1 árama teljesen rezisztens.

4. Azonosítottuk a TREK-2 ruténiumvörös-érzékenységét meghatározó aminosavat, az első extracelluláris hurkon elhelyezkedő 135-ös pozíciójú konzervált aszpartátot.

5. Felnőtt egér hátsó gyöki ganglion neuronon sikerült ruténiumvörös-érzékeny háttér K^+ áram komponenst azonosítani, és összefüggést találtunk ezen idegsejtek háttér K^+ áramának nagysága, és az áram festék iránti érzékenysége között. Eredményeink összhangban vannak egy a közelmúltban megjelent közleménnyel, mely szerint a kisebb átmérőjű DRG neuronok jelentős része TREK-2 immunoreaktivitást mutat, míg a nagyobb neuronokban ez a csatorna kisebb mértékben mutatható ki. Tehát a ruténiumvörös felhasználható a TREK-1 és TREK-2 áramok elkülönítésére heterológ rendszerben és natív sejten egyaránt.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

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

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:

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

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