

Dr. Czirják Gábor
Semmelweis Egyetem
Általános Orvosi Kar
Élettani Intézet

1094 Budapest, IX. Tűzoltó utca 37-47.
Levelezési cím: 1444 Budapest, Pf. 259.
Telefon: 459-1500/60433, telefax: 266-7480
E-mail: czirjak@eok.sote.hu



Zárójelentés

I. A retinában expresszáldó Kv8.2 alegység klónozása és a Kv2.1/Kv8.2 heteromer csatorna funkcionális jellemzése.

A pályázati periódusban az első eredményeket a Kv8.2 (KCNV2) feszültségfüggő K⁺ csatorna alegységgel értük el. Saját fejlesztésű számítógép programom a TRESK háttér K⁺ csatorna mellett ugyanis, melléktermékként, egy új feszültségfüggő K⁺ csatornát is azonosított, melynek klónozását nem sokkal később egy belga munkacsoport írta le elsőként Kv11.1 néven. A később Kv8.2-re átkeresztelt csatornát időközben mi is megklónoztuk, és élettani funkcióját vizsgálni kezdtük. Ezt a kísérletsorozatot eredetileg nem szerepeltettem OTKA pályázatom célkitűzései között, mert a belőle született eredményeket (ld. alább a részletes leírást) kezdetben több folyóiratban próbálkozva sem sikerült elfogadtatnunk. A jelen pályázati periódus elején azonban megjelent egy közlemény (1), mely munkánk megítélését alapvetően megváltoztatta (ld. alább), és néhány további kiegészítő kísérlet elvégzését követően eredményeinket a *Journal of Neurophysiology* folyóirat közlésre elfogadta (2).

Megállapítottuk, hogy a Kv8.2 nagy mennyiségben fejeződik ki a szemben, a retinában, a fotoreceptor sejtekben. A Kv8.2 *Xenopus laevis* (afrikai karmosbéka) petesejtekben kifejezve nem adott K⁺ áramot. Ha viszont egy másik K⁺ csatorna alegységgel (a retinában szintén megtalálható) Kv2.1-gyel koexpresszáltuk, akkor olyan K⁺ áram jelent meg, melynek tulajdonságai lényegesen eltértek a Kv2.1 áramától. Pl. a nyitási küszöb értéke -40 mV-nál negatívabb értékre tolódott, illetve ún. "window current" jelent meg. Ez alapján arra gondoltunk, hogy olyan feszültségfüggő K⁺ csatorna heterotetramerek jöttek létre, melyekben a Kv2.1 és Kv8.2 egyaránt szerepel. Ez a heteromerizáció megmagyarázta, hogy a Kv2.1 miért expresszáldó a fotoreceptor sejtekben. (A Kv2.1 homotetramer nyitási küszöbe (kb. -20 mV) ugyanis magasabb, mint a fotoreceptor sejtek fiziológiás (kb. -80-tól -30 mV-ig terjedő) membránpotenciál-tartománya, tehát a tisztán Kv2.1 alegységekből felépülő csatornák sose nyitnának.) Ráadásul a Kv2.1/Kv8.2 heteromer csatorna elektrofiziológiai tulajdonságai arra utaltak, hogy ez a csatorna szerepet játszik a régebben IKx néven leírt (3) K⁺ áram kialakításában, mely alapvető a fotoreceptor sejt fényfelvillanásra adott dinamikus válaszában. Ezeket az eredményeinket éveken át nem tudtuk közölni, mivel mindenhol az áram közvetlen kimutatását kérték, amit az emlős fotoreceptor sejtek igen kis mérete és egyéb technikai okok miatt nem tudtunk kivitelezni.

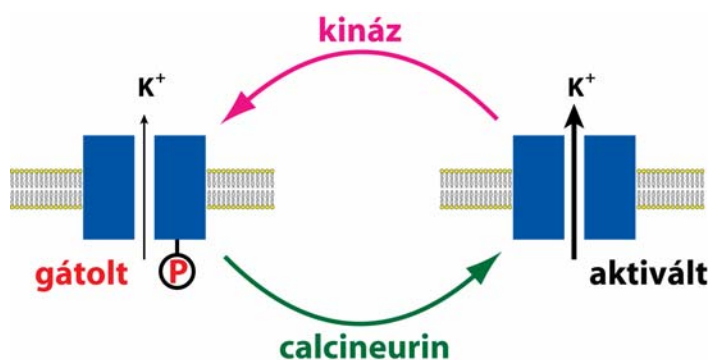
Azonban ez a helyzet 2006 végén megváltozott, mikor Wu és mtsai. leírták (1), hogy a Kv8.2 funkcióvesztő mutációi emberben retinadegenerációt és szupernormális pálcika elektroretinogramot okoznak. Ezután a Kv8.2 általunk hangoztatott jelentősége a retinában vitathatatlaná vált, ráadásul eredményeink utaltak a betegség elektrofiziológiai hátterére. Vizsgálatainkat egy betegséget okozó mutáns Kv8.2 csatorna elektrofiziológiai analizisével kiegészítve (Kv2.1-gyel heteromerizálódik, de nem ad normál heteromerre jellemző K⁺

áramot, ún. domináns negatív) végül a *Journal of Neurophysiology* folyóiratban közöltük (2). A későbbiekben, magyar kollaboráció keretében, hozzáfértünk két olyan beteg DNS mintáihoz, akiknek szupernormális pálcska elektroretinogramuk volt. Mindkét betegnél a Kv8.2 alegység genetikai hibáját detektáltuk (nem közölt eredmény). Ez arra utal, hogy a szupernormális elektroretinogram hátterében valószínűleg gyakran áll a Kv8.2 alegység genetikai eltérése.

II. A TRESK csatorna foszforilációs szabályozásáért két különböző csatorna régió és legalább két különböző kináz felelős. A 14-3-3 adapter fehérje a két gátló útvonalat jelentős mértékben, eltérő mechanizmussal szabályozza.

A pályázati időszakban a legjelentősebb eredményeinket a TRESK (Twik-Related Spinal cord K^+ channel) háttér kálium csatorna szabályozásának vizsgálata területén értük el (4,5). A TRESK két pórusdoménnal rendelkező, háttér K^+ csatornát egy saját fejlesztésű komputer programmal azonosítottam a humán genom szekvenciájában, majd ennek alapján a 2001 és 2003 közötti periódusban megklónoztuk a humán és az egér TRESK-et (6), a csatornát elsőként leíró japán gyógyszerügyi munkacsoporttól függetlenül (7). Hamar felfigyeltünk a TRESK csatorna különleges szabályozására, és ennek elemzése tette lehetővé, hogy kezdeti eredményeinket a japán munkacsoportéhoz hasonlóan a *Journal of Biological Chemistry* folyóiratban közöljük (6). Ebben a munkában igazoltuk, hogy a TRESK csatorna kalcium-mobilizáló receptorok ingerlésére vagy egyéb módon létrehozott kalcium koncentráció emelkedés hatására többszörösére aktiválódik *Xenopus laevis* petesejt heterolog expressziós rendszerben. Ez a szabályozás egyedien jellemző a TRESK csatornára, a másik 14 háttér K^+ csatorna ilyen módon nem regulálódik. Megmutattuk azt is, hogy a csatornát a kalcium/kalmodulin-dependens protein foszfátáz, calcineurin aktiválja (6). Tovább dolgozva a területen azt a meglepő felfedezést tettük, hogy a TRESK csatorna tartalmaz egy NFAT(Nuclear Factor of Activated T cells)-szerű calcineurin kötő motívumot, melyhez a calcineurin kalcium-függően közvetlenül kihorgonyzódik (8). Ilyen kötő motívumot tudtunkkal eddig egyetlen más ioncsatornában sem találtak. Egy peptideket összehasonlító vizsgálatban Li és mtsai. megmutatták (9), hogy a TRESK calcineurin-kötő motívuma a legnagyobb affinitású a ma ismert hasonló motívumot tartalmazó fehérjék közül (beleértve magát az NFAT-t is). Ezek az eredmények egyértelművé tették a calcineurin szerepét a TRESK szabályozásában, és egyben ezek képezték azt az alapot, melyből a most jelentett pályázati periódusban kiindulhattunk.

Ahogy azt a pályázat 3. és 4. célkitűzésében ismertettem, alapkonceptiónk az volt, hogy amennyiben a TRESK-et a calcineurin defoszforilálja, és így aktiválja, akkor léteznie kell egy kináznak, amely a csatornát foszforilálja és ezáltal rá gátló hatást fejt ki (ld. 1. ábra). Első közelítésként ezt a kinázt úgy próbáltuk azonosítani, hogy



1. ábra

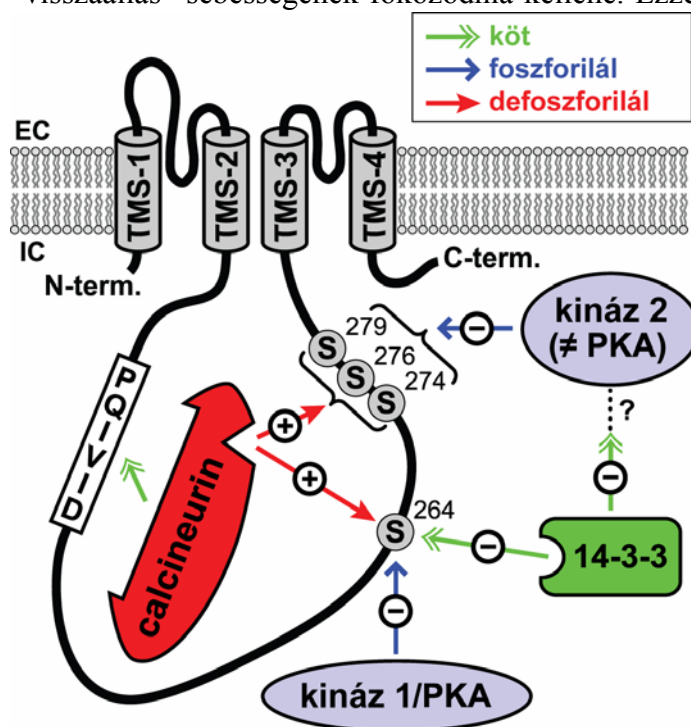
különböző kinázokat koexpresszáltunk a TRESK csatornával *Xenopus* petesejtekben. Azt reméltük, hogy valamelyik hatására felgyorsul a K^+ áram visszatérése a nyugalmi (gátolt) állapotba, az ionomycin kalcium ionofórral kiváltott kalcium koncentráció emelkedés megszűnését követően. Ez a megközelítés azonban nem vezetett eredményre. Megfigyelt-

tük, hogy a K^+ áram visszatérése a nyugalmi állapotba (innenről “visszaállás”), igen nagy szórást mutat sejtenként, sőt az egyéb általunk régebben vizsgált biológiai paraméterekhez képest petesejt preparátumonként is. Ez a nagy szórás rendkívül megnehezítette a koexpresszált kinázok hatásának megítélését. Szerencsés módon ekkoriban vettem észre, hogy a csatorna intracelluláris hurok régiója tartalmaz két feltételezett kötőhelyet a 14-3-3 adapter fehérje számára, és ennek kapcsán felmerült a kérdés, vajon tényleg kötődik-e ez a fehérje, illetve ha igen, akkor mi lehet a funkcionális jelentősége.

In vitro, biokémiai kísérletekben egyértelműen bizonyítottuk, hogy a két feltételezett kötőhely közül az egyik (az RSNSCP motívum) tényleg köti a 14-3-3 adapter fehérjét, amennyiben a motívumban található második (TRESK-ben 264-es) szerint előzőleg protein kináz A-val megfoszforiláltattuk (4). Ezért megvizsgáltuk, hogy a 14-3-3 kötődése a TRESK-hez hogyan befolyásolja a csatorna működését. Ha a 14-3-3 fehérjét koexpresszáltuk a TRESK csatornával, akkor az ionomycinnel kiváltott ingerlést követően a “visszaállás” lelassult. Ha viszont domináns negatív 14-3-3 koexpressziójával az endogén 14-3-3 funkcióját gátoltuk, akkor a “visszaállás” gyorsult (4). Hasonló eredményt kaptunk a 14-3-3 kötőhelyét telítő, és ezáltal 14-3-3-at szintén gátló, pS-Raf259 foszfopeptid mikroinjektálását követően is (4). Ezek az eredmények mutatták, hogy a 14-3-3 befolyásolja a “visszaállást”, vagyis azt a paramétert, melyet mi eredendően a keresett kináznak tulajdonítottunk. Mivel előzőleg alanin-pásztázó mutagenezissel meghatároztuk, hogy a calcineurin (és így a kináz) valószínű célpontja a 276-os szerin (6), feltételeztük, hogy a 14-3-3 kötődése az RSNSCP motívumhoz akadályozza ennek az aminosavnak a foszforilációját (4).

Következő kísérleteink azonban arra utaltak, hogy a szabályozás ennél összetettebb. Az első anomáliát a fenti elképzeléstől akkor észleltük, mikor megvizsgáltuk az S264A mutáns TRESK csatorna calcineurin-függő szabályozásának kinetikáját. Ebben a mutánsban a 14-3-3 kötéséhez szükséges foszforiláció nem jöhet létre, ezért az adapter fehérje nem tud a mutáns szekvenciához kötődni, ahogy azt in vitro kísérletesen is kimutattuk (4). A fenti elképzelés szerint ilyenkor a 14-3-3 nem akadályozhatja a 276-os szerin foszforilációját, vagyis a “visszaállás” sebességének fokozódnia kellene. Ezzel éles ellentétben azonban a valóságban azt kaptuk, hogy az S264A mutáns “visszaállása” igen lassú (5). Emellett azt is észrevettük, hogy az S264A mutáns részlegesen aktív nyugalmi körülmények között, ami arra utalt, hogy a 264-es szerin is részt vesz a csatorna aktivitásának szabályozásában, a 276-os szerin mellett. Ezek a váratlan fejlemények arra sarkalltak bennünket, hogy alaposan megvizsgáljuk az S264E és S276E mutánsok calcineurin-függő szabályozását, illetve ennek függését a 14-3-3-tól (5).

Ezekben a kísérletekben alanin helyett negatív töltésű glutamáttal helyettesítettük a szerineket. Míg az S276A mutáns konstitutívan aktív (6), addig az S276E mutáns szabályozódik, de kisebb mértékben, mint a vad típusú csatorna (5). Ez is



2. ábra

egybehangzó azzal, hogy nem csak a 276-os szerin szabályozza a csatorna aktivitást. Az S264A és S264E mutánsok azonos módon regulálódtak (a vad típushoz képest csökkent mértékben). Az S264E/S276E dupla mutáns csatorna viszont nem mutatott kalcium-függő szabályozást. Mindezek az eredmények arra utaltak, hogy két régió (a 264-es szerin, illetve a 276-os szerin, esetleg együtt az azt megelőző/követő 274-es és 279-es szerinnekkel) foszforilációja egyaránt jelentős a kalcineurin-függő szabályozásban (2. ábra).

Úgy tűnik, a két régiót, melynek foszforilációja gátolja a TRESK csatorna aktivitását, különböző kinázok foszforilálják. Kimutattuk, hogy a protein kináz A *in vitro* (4) és *Xenopus* petesejtekben (5) mint endogén enzim (cAMP mikroinjektálás hatására) foszforilálja a 264-es szerint. A 276-os (és 274-es, illetve 279-es) szerin(ek)e)t a protein kináz A *in vitro* nem foszforilálta. Ha azonban egér agyból gélfiltrált (ATP-mentesített) citoszolt készítettünk, akkor az foszforilálta az S276 régiót (5), mutatva, hogy létezik olyan (a protein kináz A-tól eltérő) kináz, melynek ez a régió szubsztrátja (ld. kináz 2 a 2. ábrán).

Az S264E és S276E mutánsok analízisével lehetőség nyílt a 14-3-3 két különböző gátló útvonalra kifejtett hatásának célzott vizsgálatára. Az S264E mutáns esetében ugyanis a 264-es szerin nem foszforilálódhat, és így az S276 régió szabályozása elkülönítve vizsgálható. Illetve fordítva, az S276E mutánsban a másik szabályozó régiót tettük működésképtelenné, ezért ennél a mutánsnál a 264-es szerin szabályozó szerepe nyilvánul meg. Előzetes várakozásainkkal ellentétben, a 14-3-3 erőteljesen befolyásolta az S264E (és S264A) mutáns kalcium-függő szabályozását, annak ellenére, hogy a 14-3-3 ezekhez a mutáns csatornához nem kötődhet. Az adapter fehérje jelenlétében a "visszaállás" lassúnak bizonyult, míg hiányában felgyorsult (5). Ez úgy magyarázható, hogy a 14-3-3 a csatornához kötődésétől függetlenül, (közvetlen vagy közvetett módon) gátolja a S276 régiót foszforiláló kinázt (ld. a ?-lel jelölt útvonalat a 2. ábrán). Ez a vad típusú csatorna mérésével fel nem ismerhető mechanizmus felelős a kiindulásnál tapasztalt anomáliáért, vagyis hogy az S264A mutáns "visszaállása" (az endogén 14-3-3 jelenlétében) lassú. Az S276E mutáns vizsgálatánál pedig azt kaptuk eredményül, hogy a 14-3-3 közvetlen kötődése a 264-es pozícióban foszforilált csatornához hozzájárul a csatorna gátolt állapotának kialakításához (5).

A pályázati periódusban végzett kísérleteink alapvetően megváltoztatták a TRESK szabályozásáról kialakított elképzeléseinket (vö. 1. és 2. ábra). Most, hogy megértettük, hogy két gátló foszforilációs útvonal konvergál a TRESK csatornán, nagyon érdekes lenne tudni, milyen információt továbbítanak ezek az útvonalak a hátsó gyöki (illetve trigeminus) ganglion érző neuronjaiban, ahol a csatorna nagy mennyiségben kifejeződik. A háttér K^+ áram gátlása a pseudounipoláris érző neuronokban várhatóan fokozza az ingerlékenységet, ezáltal pedig hozzájárul a központi idegrendszer érző bemenetének szabályozásához. Ennek az érző bemenetnek része a fájdalomérzés, és ezért többen felvetették a TRESK lehetséges szerepét a fájdalom szabályozásában, illetve egyes fájdalom szindrómákban (10-13).

Mivel a kinázok jelentős hányadáról kiterjedt ismeretanyag áll rendelkezésre, várható, hogy a TRESK-et gátló kinázok pontos azonosítása elősegíti annak a megértését is, hogy *in vivo* milyen tényezők szabályozzák a TRESK csatornát. Visszatekintve, amíg nem tudtuk, hogy nem egy, hanem kétféle kinázt kell keresnünk, és hogy a 14-3-3 különböző módon modulálja a két gátló mechanizmust, nem sok esélyünk lehetett a gátló kinázok megtalálására. Tovább lépésként *in vitro* kináz assay-t állítottunk be a 264-es és 276-os szerinek foszforilációjának vizsgálatára. Ezek alkalmazásával megkezdtük a kináz aktivitások oszlopkromatográfiás tisztítását, mely folyamat végén a fehérjék tömegspektrometriás azonosítását tervezzük. Előkísérleteink első váratlan eredménye, hogy úgy tűnik, egér agy citoszolban a legjelentősebb S264-et foszforiláló kináz aktivitásért (kináz 1 a 2. ábrán) nem a protein kináz A felelős (nem közölt eredmény).

III. Összefoglaló tanulmány a háttér K⁺ csatornák témakörében.

Laborvezetőnk, Prof. Enyedi Péter igen megtisztelő felkérést kapott egy háttér K⁺ csatornákról szóló összefoglaló tanulmány megírására a terület legjelentősebb összefoglalókat közlő folyóiratától, a *Physiological Reviews*-tól (IF(2009): 37.726). Az elmúlt hónapokban együtt készítettük el az átfogó tanulmányt, mely a két pórusdoménal rendelkező K⁺ csatornák szabályozásának sajátosságait és a csatornák élettani jelentőségét tárgyalja. A kétszerős közlemény a pályázati periódusban megjelent (14). A közleményben az OTKA pályázatomból számát feltüntettük.

IV. A pályázat célkitűzéseinek megfelelő további részeredmények.

A pályázat keretében tovább kívántuk vizsgálni a háttér K⁺ csatornák szerepét rágcsáló aldosteron termelő glomerulóza sejtben, illetve kíváncsiak voltunk arra, hogy emberben a glomerulóza sejt háttér K⁺ áramáért elsősorban mely csatornák felelősek (1. és 2. célkitűzés). Korábban elsőként mutattuk ki ugyanis (15,16), hogy patkányban a TASK-1 és TASK-3 csatornák döntően meghatározzák a glomerulóza sejt K⁺ konduktanciáját és alapvetők a sejt aldosteron termelése szempontjából, pl. az angiotenzin II-re adott válasz kialakításában. A pályázati periódusban két független közlemény is megjelent más laboratóriumokból rangos folyóiratokban (17,18), melyek génhiányos egerek alkalmazásával vizsgálták a TASK csatornák jelentőségét a glomerulóza sejtben. Ezek egyaránt megerősítették a korábbi eredményeinket, a TASK-1 és TASK-3 döntő szerepét a glomerulóza sejt K⁺ áramának kialakításában, és emellett azt találták, hogy a TASK-1 (vagy TASK-1 és TASK-3) hiánya primer hiperaldoszteonizmust okoz. Habár továbbra is maradtak nyitott kérdések, ezt követően a TASK csatornák funkcionális jelentősége a rágcsáló glomerulóza sejt aldosteron termelésében általánosan elfogadottá vált.

Saját real-time PCR eredményeink azt mutatták (nem közölt eredmény), hogy humán glomerulóza sejtben, illetve a H295R humán glomerulóza sejt vonalban a két pórusdoménal rendelkező háttér K⁺ csatornák közül elsősorban a TASK-1 és a TREK-1 mRNS fejeződik ki nagy mennyiségben. Ez az eredmény eltér a Brenner és mtsai. által közelmúltban közölt indirekt következtetésektől (19), melyek szerint a TREK-1 mellett döntően a TASK-3 lenne felelős a H295R sejtek háttér K⁺ áramáért. Teljes sejt patch clamp méréseink során a H295R sejtek K⁺ árama nem volt érzékeny ruténium vörösre (nem közölt eredmény), mely a TASK-3 csatornák hatékony gátlószere. Mindezek arra utalnak, hogy a TASK-3 szerepe kizárható és az áramot többségében TASK-1 és TREK-1 alkotja. Ennek a gondolatkörnek a teljessé tételéhez fontos lenne meghatározni a TASK-1 és TREK-1 áramok arányát az emberi glomerulóza sejtben. A TASK-1 és a TREK-1 elektrofiziológiai elkülönítésénél azonban nehézségekbe ütköztünk. A humán TREK-1 (eltérően pl. az egér csatornától) kifejezetten érzékeny az extracelluláris pH-ra, és ezért egyszerűen a pH-érzékenység mérésével nem könnyen különíthető el tőle az erősen pH-érzékeny TASK-1. Néhány, az irodalomban erre a célra alkalmazott farmakológiai ágens (pl. verapamil, doxapram, curcumin) szintén nem bizonyult különösebben szelektívnek, és így alkalmasnak a kétféle áram elkülönítésére. A humán TASK-1 és TREK-1 áram részarányának meghatározásához megfelelően szelektív gátlószerekre lenne szükség.

A pályázat célkitűzéseinek megfogalmazásakor azt reméltük (5. célkitűzés), hogy a TREK új interakciós partnerének meghatározása megmagyarázza majd azt, hogy a csatorna aktiválódása miért nem detektálható ionomycin hatására, ha a csatornát COS vagy HEK emlős sejt expressziós rendszerben fejezzük ki. A pályázati periódusban azonosítottunk is egy újabb közvetlen interakciós partnert, a 14-3-3-at (4), azonban ennek a fehérjének a koexpressziója a csatornával nem eredményezte a reguláció megjelenését az emlős

rendszerekben (nem közölt eredmény). Lehetséges, hogy a TRESK különböző expressziós rendszerekben mutatott eltérő viselkedéséért még további (egyelőre nem azonosított) fehérjepartnerek felelősek, de látva a csatorna pályázati periódusban megismert meglehetősen összetett szabályozását, az is felmerül, hogy a csatorna foszforilációs állapota tér el lényegesen az emlős sejtekben (hiányzó, vagy rendkívül erős kináz aktivitás az egyes gátló útvonalakon) a *Xenopus* rendszerre jellemzőtől. Míg a potenciális további partnerfehérjét és a kinázokat nem azonosítottuk, támpont nélkül maradunk ennek az érdekes kérdésnek a megválaszolásában.

Többféle TRESK mRNS-t feltételezetten vagy bizonyítottan kifejező szövetből izolált sejten (placenta, here, egér oocyta, kisagyi Purkinje neuron) is megkísérletem a teljes sejt TRESK áram elkülönítését (a pályázat 6. célkitűzésének megfelelően, cink és higany ionok felhasználásával, (20)). Ezek a próbálkozások azonban nem jártak eredménnyel, talán elsősorban a csatorna aránylag alacsony expressziós szintje miatt a vizsgált sejtípusokban. Később, a pályázati évek során konszenzus alakult ki az irodalomban arról, hogy a TRESK csatorna bőségesen a hátsó gyöki ganglion érző neuronjaiban fejeződik ki (10,21-23). Saját real-time PCR eredményeink egybehangzóak ezzel az elképzeléssel. A TRESK nagyságrendileg nagyobb mennyiségben található a hátsó gyöki ganglionokból tisztított mRNS-ben (a GAPDH enzimhez vagy β -actinhez képest), mint az általunk korábban vizsgált szövetekben (nem közölt eredmény). Mindezek ellenére, mind a mai napig, senki nem közölt natív sejten, egyértelműen igazolt, teljes sejt felállásban mért TRESK áramot. Hasonlóképpen, a pályázati periódus zárásáig mi sem tudtuk a TRESK áramát elkülöníteni érző neuronban (vagy az ennek megfelelő F11 sejt vonalban (5)), mivel ezek a sejtek igen sokféle K^+ áramot (és ezen belül számos háttér K^+ csatornát) kifejeznek. Az utóbbi időben az a lehetőség is felvetődött, hogy a TRESK csatorna nem a mindenki által mért neuron sejttestben, hanem (a szokásos izolálási eljárásnál eltávolított) nyúlványokban működik. Ennek a hipotézisnek a tesztelése jelentős metodikai újításokat igényel majd a jövőben.

Bibliográfia

1. Wu H, Cowing JA, Michaelides M, Wilkie SE, Jeffery G, Jenkins SA, Mester V, Bird AC, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Hunt DM, Webster AR 2006 Mutations in the gene KCNV2 encoding a voltage-gated potassium channel subunit cause "cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram" in humans. *Am J Hum Genet* 79:574-579
2. Czirják G, Tóth ZE, Enyedi P 2007 Characterization of the heteromeric potassium channel formed by kv2.1 and the retinal subunit kv8.2 in *Xenopus* oocytes. *J Neurophysiol* 98:1213-1222
3. Beech DJ, Barnes S 1989 Characterization of a voltage-gated K^+ channel that accelerates the rod response to dim light. *Neuron* 3:573-581
4. Czirják G, Vuity D, Enyedi P 2008 Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J Biol Chem* 283:15672-15680
5. Czirják G, Enyedi P 2010 TRESK background K^+ channel is inhibited by phosphorylation via two distinct pathways. *J Biol Chem* 285:14549-14557
6. Czirják G, Tóth 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
7. 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

8. Czirják 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
9. Li H, Zhang L, Rao A, Harrison SC, Hogan PG 2007 Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *J Mol Biol* 369:1296-1306
10. 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
11. Smith HS 2009 Calcineurin as a nociceptor modulator. *Pain Physician* 12:E309-E318
12. Huang DY, Yu BW, Fan QW 2008 Roles of TRESK, a novel two-pore domain K⁺ channel, in pain pathway and general anesthesia. *Neurosci Bull* 24:166-172
13. Gerhold KA, Bautista DM 2009 Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann N Y Acad Sci* 1170:184-189
14. Enyedi P, Czirják G 2010 Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 90:559-605
15. Czirják G, Fischer T, Spät 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
16. Czirják G, Enyedi P 2002 TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 16:621-629
17. 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
18. 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
19. 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
20. Czirják G, Enyedi P 2006 Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol Pharmacol* 69:1024-1032
21. 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
22. Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R, Wischmeyer E, Döring 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
23. 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