

## Új feszültségfüggő és 2P típusú kálium csatornák klónozása és szerepük vizsgálata (OTKA 46954) Beszámoló (zárójelentés)

A kálium csatornák szerkezetük és működésük alapján három nagy alcsaládba sorolhatók; a feszültségfüggő, a befelé rektifikáló és a 2P típusú, a legyesegeként két pórusformáló aleggységet tartalmazó és alapvetően háttér kálium áramot biztosító alcsaládba. Az összes kálium csatornára jellemző azonban a pórusformáló doménben megtalálható u.n. signature szekvencia, melynek aminosavai a csatorna ionszelektivitását biztosítják. Korábbi munkáinkban a 2P családba tartozó TASK (**T**WIK related **a**cid **s**ensitive **K**<sup>+</sup> channel) funkcióját és szabályozását vizsgáltuk. A most záródó OTKA támogatás segítségével további –a pályázat indulásakor ismeretlen- kálium csatornák klónozását és vizsgálatát tűztük ki célul.

A klónozási terv azon alapult, hogy a publikussá vált humán genom-ot egy általunk kifejlesztett computer programmal screen-eltük, aminek eredményeképpen 2 olyan bázisszekvenciára bukkantunk, melyekben nyitott olvasási keretbe helyezve a “signature szekvencia” felismerhető volt. Ez alapján kezdtük el megklónozni az akkor még nem annotált ismeretlen génszakaszokat. A humán genom DNS szekvenciájából “in silico” összeállítottuk a csak exonokat tartalmazó hipotetikus mRNS/cDNS szekvenciákat: az egyik egy új 2P típusú, a másik egy feszültségfüggő kálium csatorna jellegzetességeit mutatta. A csatorna fizika megklónozásához azonban olyan szövetből származó mRNS-re volt szükség, mely szövetben a csatorna expresszáldott. A 2P jellegű csatorna e tekintetben nehéz feladatot jelentett, nem fértünk hozzá megfelelő humán szöveti RNS-hez. Ezért azt az utat választottuk, hogy a csatorna hipotetikus exonjait sokszoroztuk PCR segítségével genomiális DNS-ből, majd ezeket az exonokat összeépítettük. E konstrukciót *Xenopus laevis* oocytákban expresszáldva működőképes csatornát kaptunk. Az időközben ugyancsak ismertté vált egér genom alapján az egér csatornát is megklónoztuk. A csatorna szabályozása igen izgalmasnak ígérkezett, ugyanis a kalcium mobilizáló receptorok ingerlésének hatására az áram drámaian (közel 10x-esére) növekedett. E szabályozás mechanizmusát is szeretnénk volna tisztázni, ez a késlekedés vezetett ahhoz, hogy a TRESK klónozásáról szóló közleménnyel egy japán munkacsoport megelőzött minket. Saját TRESK-kel kapcsolatos első közleményünk kísérleteinek jelentős része az OTKA pályázat benyújtása és a támogatás odaítélése között készült, és már ennek az OTKA periódusnak az első évében megjelent.

A TRESK receptor-függő aktivációjának mechanizmusa egyedülálló a 2P csatornák között (annak ellenére, hogy a TASK csatornákat is szabályozzák Gq kapcsoló fehérjén keresztül ható receptorok). TASK esetében azonban a receptor aktiválásakor a csatorna gátlódik, és e hatás mögött a plazmamembrán foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátjának (PIP<sub>2</sub>) lebomlása áll. Ezzel szemben a TRESK aktivációjához az IP<sub>3</sub> keletkezése és a következményes kalcium szignál kialakulása vezet: az intracelluláris raktárakból kalciumot mobilizáló IP<sub>3</sub> injektálásával, a kalcium ionfor ionomicinnel és a sejtbe kalcium/EGTA puffer injektálásával is TRESK áram fokozódást lehetett kiváltani. A kalciumot megkötő EGTA injektálása pedig kivédte a kalcium mobilizáló agonisták hatását mutatva, hogy az intracelluláris [Ca<sup>2+</sup>] növekedése szükséges és elégséges feltétele a TRESK aktivációnak. Kimutattuk, hogy az intracelluláris kalcium koncentráció növekedése nem közvetlenül szabályozza a csatornát. Kivágott membrándarabon, u.n. “excised inside out” felállásban a kalcium koncentráció megemelése (az intracelluláris oldalon) nem befolyásolta az egy-

csatorna áram amplitúdóját, ill. a nyitási valószínűséget. Először farmakológiai eredmények utaltak arra, hogy milyen intracelluláris jelpálya teremti meg a kapcsolatot a  $[Ca^{2+}]$  és a TRESK között. Ciklosporin és FK506 ugyanis teljesen kivédte az aktivációt. E klinikumban is használt szerek a calcineurint gátolják, ami egy szerin/treonin foszfatáz, eredményünk tehát azt valószínűsítette, hogy a csatorna aktivációját valamely konstitutívan foszforilált aminosav defoszforilációja eredményezi. Annak ellenére azonban, hogy az általunk használt két szer eltérő hatásmechanizmussal gátolja a calcineurint, munkahipotézisünk alátámasztására közvetlenebb bizonyítékot akartunk kapni. Ezért a TRESK-et is kifejező petében konstitutívan aktív calcineurint expresszáltunk. Ennek hatására a petéken jelentkező alapáram megnövekedett, míg a kalciummal való aktiválhatóság mértéke csökkent; ami azt mutatta, hogy a csatornák már kalcium jel nélkül is (részben) aktiválva voltak. Overexpresszió esetén a petében napokig magasabb a calcineurin aktivitás, aminek összetettebb következménye is lehet. Ezért akut körülmények között is megvizsgáltuk a konstitutívan aktív calcineurin hatását oly módon, hogy a fehérjét bakteriális rendszerben expresszáltattuk, megtisztítottuk és az árammérés előtt beinjektáltuk a petékbe. Az áram megnövekedése ilyen körülmények között is alátámasztotta eredeti elképzelésünket. További kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy melyik aminosav lehet a csatornán a calcineurin szubsztrátja. Ennek eldöntésére alanin scanning mutagenézist végeztünk, a csatorna összes intracelluláris szakaszán található szerin-, ill. treonin aminosavat alaninra cseréltük. E mutáns csatornák áramait vizsgálva (a vad típushoz képest) a legnagyobb különbséget az S276A mutáns mutatta. E csatorna alapárama nagy volt és alig volt stimulálható. Tekintettel arra, hogy az alanin mutáns nem töltött aminosavat tartalmaz az adott pozícióban, e tekintetben hasonlít a defoszforilált (tehát aktivált) formájára a vad típusú csatornának. Ugyanezt az eredményt mutatta, az a mutáns is, melyben a 276-os szerinre ciszteinre cseréltük: ez az aminosav térszerkezetileg legjobban hasonlít a szerinre, de nem foszforilálódhat. Előállítottunk olyan mutáns csatornát is, melynek a 276-os pozíciójába glutamátot vittünk be. Ez a mutáns (mely a negatív töltése miatt a 276-os pozícióban (konstitutívan) foszforilált vad típusú csatornára hasonlít) alacsony alapaktivitással rendelkezett, és ugyancsak alig volt aktiválható –ami jól egybevágott az eredeti munkahipotézisünkkel. A TRESK csatorna szabályozásának legfontosabb eleme tehát egy reverzibilis foszforiláció/defoszforiláció melyek közül az utóbbi jelenti a meglehetősen gyorsan kialakuló aktivációt, ezzel szemben a foszforilációs lépés igen lassú és egyelőre nem ismerjük, hogy melyik kináz az, amelyik felelős érte a sejtben. A lassú inaktiváció viszont felveti azt a lehetőséget, hogy ingerlékeny sejtekben –melyek a TRESK-et expresszálják- a tartósan magas kálium konduktancia miatt hosszan tartó csökkent ingerlékenység, kalcium jeltől függő LTD (long term depression) alakuljon ki (J. Biol. Chem. 2004;279(18):18550-8.).

A 2P típusú kálium csatornák szivárgó csatornák, tehát nyitvatartásukat a membránpotenciál nem, vagy csak kismértékben befolyásolja. Makroszkópos áramaik elkülönítése emiatt csak farmakológia módszerekkel (ill. néhány csatorna esetében szabályozásuk alapján lehetséges). Korábbi kísérleteinkben a TASK csatornák közötti megkülönböztetésre a ruténium vöröst alkalmaztuk sikeresen. A TRESK áram egyéb 2P csatornák áramaitól való elkülönítésére kerestünk megfelelő gátlószereket, melyek közül a higany és a cink alkalmasnak bizonyult erre a célra. Mivel natív szövetekben többféle 2P csatorna is expresszálódhat ugyanabban a sejtben e farmakológiai eszköz segítséget nyújthat a csatorna azonosításához (Mol Pharmacol. 2006; 69(3):1024-32). További kísérleteink kapcsán egy további fontos farmakológiai felismerést is tettünk: a benzokain eltérő mértékben gátolta az alap TRESK áramot (kb. 10%), ill. az aktivált

csatorna áramát (kb. 50%). Ez a felismerés lehetővé tette, hogy a mutáns csatornák esetében nyugalmi körülmények között kapott áram nagyságát a csatorna expressziójának mértékétől függetlenül tudjuk értékelni (J Biol Chem. 2006; 281(21):14677-82).

A TRESK calcineurin általi szabályozásának egy további elemét is sikerült tisztázni. E felismeréshez az vezetett, hogy a calcineurin és (klinikai szempontból) legfontosabbnak tekinthető szubsztrátja, az NFAT (nuclear factor of activated T cells) között -kristályszerkezet meghatározással is igazolt- interakció jön létre. Ez a kapcsolat független a katalitikus domén/szubsztrát pozíciótól, és az NFAT-n egy rövid peptid motívum határozza meg, mely hasonlít, a VIVIT arteficialis peptidszekvenciához. Amennyiben ezt a kötődést (farmakológiai) módon gátolják, a calcineurin nem aktiválja az NFAT-t, annak ellenére, hogy más szubsztrátokat továbbra is képes defoszforilálni. Az NFAT T sejt aktivációban betöltött alapvető szerepe miatt e kapcsolat farmakológiai gátlása az immunszuppresszív terápia egy új lehetőségét kínálja. E kérdéskörhöz kapcsolódik, hogy a TRESK intracelluláris hurok szakaszán felismertünk az NFAT calcineurin kötő helyéhez hasonló szekvenciát: PQIVID. Kimutattuk, hogy a csatorna hurok szakasza köti a calcineurint, de annak csak kalcium/kalmodulinnal aktivált formáját. E kötődés szükséges a csatorna aktiválásához, ugyanis a PQIVID szekvenciában mutációkat hozva létre a csatorna aktiválhatósága megszűnt, a vad típusú csatorna aktivációját, pedig a kötéssel kompetáló u.n. VIVIT-peptid petesejtbe való injektálásával ki lehetett védeni (J Biol Chem. 2006; 281(21):14677-82).

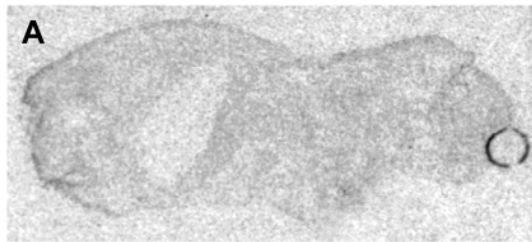
Eredményeink alapján tehát a csatorna működésének szabályozását a következőképpen képzelhetjük el: nyugalmi körülmények között a csatorna konstitutívan foszforilált, kis aktivitású állapotban van. Kalcium jel hatására a calcineurint a kalcium/kalmodulin aktiválja ez egyrészt lehetővé teszi a komplex kötődését a TRESK hurok PQIVID szekvenciájához, másrészt az aktivált calcineurin defoszforilálja –által aktiválja- a csatornát. A kalcium jel megszűnése után a csatorna aktivitása igen lassan áll vissza a nyugalmi szintre. Előzetes eredményeink szerint ebben a feltehetően foszforiláción alapuló „inaktiválódásban” további fehérje-fehérje kölcsönhatások is szerepet kapnak, a TRESK tehát minden valószínűség szerint egy összetett szignalizációs komplex részét képezi.

Komoly erőfeszítéseket tettünk a TRESK szabályozás másik ágának az inaktiválás mechanizmusának tisztázására: kísérleteink arra irányultak, hogy megtaláljuk azt a kinázt, ami a csatornát inaktiválja. A szabályozásban szerepet játszó szerin aminosavak szomszédságában lévő motívumok, valamint a csatorna inaktiválását befolyásoló drogok több kináz lehetőségét is felvetették. Ezek közül a legvalószínűbbnek tűnő kinázokat meklónoztuk (egy részüket konstitutívan aktív formában), koexpresszáltuk a csatornával *Xenopus* petesejtben, és néztük ennek eredményét az aktiváció megszűnésére. Eddigi vizsgálatainkkal kizártuk a GSK3, a casein kináz 2, a protein kináz A, a CaM kináz II szerepét, további kinázok vizsgálata jelenleg is folyamatban van, a foszforiláció/inaktiváció sebeségét azonban legújabb eredményeink szerint a fent említett egyéb fehérje interakciók jelentősen módosíthatják, így a továbblépéshez azok pontos analízise szükséges.

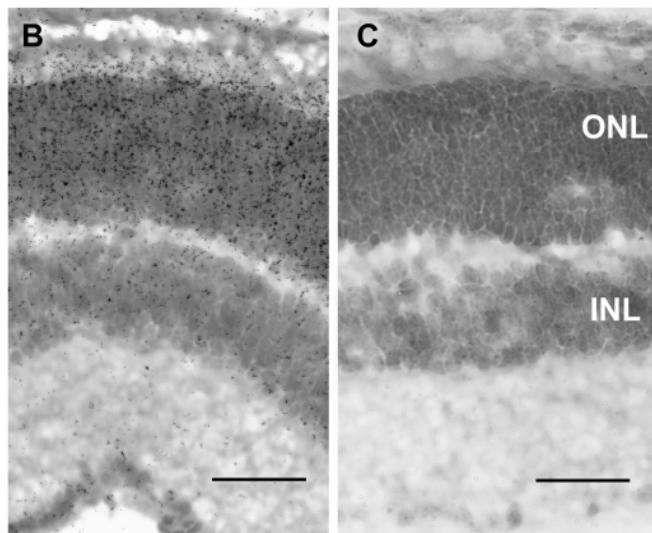
A csatorna természetes előfordulásának kimutatására nagy érzékenységgű real time RT-PCR módszert állítottunk be. TRESK mRNS-t már 1 db egér petesejtből is ki tudunk mutatni. Ezzel nemcsak megerősítettük korábbi hagyományos PCR-ral kapott eredményeinket (miszerint a TRESK kifejeződik egér petesejtekben), de kimutattuk azt is, hogy a csatorna GAPDH-ra vonatkoztatott mennyisége petesejtekben kiemelkedően magas a többi szövethez viszonyítva. Ez egybevág azokkal az irodalmi

(adatbázis) adatokkal, miszerint a csatorna EST klónjainak többsége petesejtből származik. Többféle ellenanyag előállításával próbálkoztunk a TRESK fehérje szintű kimutatására, ezek a natív szövetben expresszálandó fehérje kimutatására egyelőre nem bizonyultak alkalmasnak.

A humán genom screen-elésével kapott másik olyan találatunk, mely a kálium csatornákra jellemző „signature szekvenciát” tartalmazta, az *in silico* összeállítás alapján a feszültségfüggő kálium csatornákra jellemző szerkezetet mutatta. PCR-rel sokszorosítottuk egy szakaszát és ezt használtuk *in situ* hibridizációhoz. Eredményünk szerint a csatorna szinte kizárólag a szemben, a fotoreceptor sejtekben expresszálandó.



A/ újszülött egér parasagittális metszeten *in situ* hibridizáció antiszenz Kv8.2 probe-bal



Egér retina *in situ* hibridizációja antiszenz (B), ill. szenz (C) Kv8.2 probe-bal (ONL: külső nukleáris réteg, INL: belső nukleáris réteg).

Megklónoztuk a csatornát (Kv8.2), mely azonban önmagában kifejezve *Xenopus* oocytákban nem eredményezett áramot. Tekintettel arra, hogy a feszültségfüggő kálium csatorna alegységek közül több is heteromerként működik, koexpresszáltuk a szemben ugyancsak kifejeződő Kv2.1-gyel. Ekvimoláris expresszió esetén a Kv8.2 teljesen meggátolta a Kv2.1 működését is. Ha azonban a Kv8.2 arányát lecsökkentettük (ami feltehetőleg azt jelenti, hogy a tetramerben csak egy Kv8.2 van) egy új tulajdonságokkal rendelkező áram jelent meg. Az aktivációs, inaktivációs ill. deaktivációs paraméterek alapján kiderült, hogy ezen a heteromer csatornán keresztül u.n. window áram folyhat.

A fotoreceptor sejtek fény hatására hiperpolarizálódnak (ez a fényérzékelés alapja). Régóta ismert volt, hogy a fényfelvillanásra adott hiperpolarizációt amplifikálja egy  $I_{KX}$ -nek nevezett kálium áram, aminek a háttere azonban ismeretlen volt. Modellkísérletben, *Xenopus* oocytákban expresszált csatornákkal kimutattuk, hogy egy gyors hiperpolarizáló impulzus amplitudója Kv2.1/Kv8.2 jelenlétében tranziesen fokozódik, tehát hasonló jelenség tapasztalható, mint a fotoreceptorokban. Ilyen jelenség nem volt észlelhető sem Kv2.1-et önmagában expresszálandó, sem más

(2P típusú csatornát kifejező) oocytákon. A Kv8.2 fotoreceptorokban betöltött fontos fiziológiai szerepét mutatja, hogy mutációi egy speciális retinadegenerációhoz vezetnek. Klónozott csatornákon létrehoztuk az egyik betegséget okozó mutációt, és kimutattuk, hogy ez a mutáns Kv8.2 nem tudta Kv2.1-gyel együtt a hiperpolarizáló túllövést létrehozni a petesejt modellben. Eredményeink tehát egyértelműen igazolják a retinában a Kv8.2 szerepét (J. Neurophysiol. 2007; 98(3):1213-22).

Korábbi –OTKA által támogatott– munkánk az ugyancsak 2P K<sup>+</sup> csatornák közé tartozó TASK-1 és TASK-3 csatornák szabályozásának kérdéseire irányult. E csatornákról korábban kimutattuk és közöltük, hogy receptor-mediált szabályozásuk a foszfolipáz C aktiválás eredménye, de független az IP<sub>3</sub> képződéstől, ill. az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint megváltozásától. Valószínűsítettük, hogy a csatorna működését a plazmamembrán PIP<sub>2</sub> szint csökkenése befolyásolja. A jelen OTKA periódusban igazoltuk ezt az elképzelést; PIP<sub>2</sub> tartalmú liposzómák beépülése a plazmamembrán intracelluláris oldalára aktiválta a TASK csatornákat, míg PIP<sub>2</sub> ellenanyag gátló hatása volt (J Physiol. 2005; 564(Pt 1):117-29).

Vizsgálatot folytattunk a célból, hogy vajon 2P típusú kálium csatornák játszhatnak-e szerepet granulociták baktérium ölésében. Egy 2004-es Nature-ben megjelent közlemény szerint ugyanis a granulociták baktériumölésében alapvető fontosságú a kalciummal aktivált BK csatorna. Saját eredményeink azonban cáfolták ezt az elképzelést, mivel sem BK csatornára jellemző elektrofiziológiájú áram nem volt detektálható, sem a BK specifikus gátlószere nem akadályozta meg a baktériumok elpusztítását (J. Gen. Physiol. 2006; 127(6):659-72). Felmerült azonban, hogy a 2P kálium csatornák valamelyike expresszálná granulocitákban. Hagyományos RT-PCR-rel kimutattuk, hogy e csatornák közül a TALK-2 expressziója a legnagyobb, sőt a granulocyták differenciálódása során változik. A TALK expressziós szintjét real time PCR-rel kvantitatívan meghatározva és GAPDH-expresszióhoz viszonyítva azonban kiderült, hogy hogy még e 2P csatorna expressziójának mértéke sem közelíti meg a fiziológiásan érdelemleges mértéket.