

**A TASK-1 háttér K<sup>+</sup> csatorna és receptor  
mediált szabályozása**

Doktori (PhD) értekezés

**dr. Czirják Gábor**

**Témavezető: dr. Enyedi Péter**

**Budapest, 2002**

Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet  
Celluláris és Molekuláris Élettan Program

## Tartalomjegyzék

<b>Összefoglaló</b> .....	<b>4</b>
<b>Summary</b> .....	<b>5</b>
<b>Bevezetés</b> .....	<b>6</b>
<b>Irodalmi háttér</b> .....	<b>8</b>
<i>A K<sup>+</sup> csatornák szerepe a nyugalmi potenciál kialakításában</i> .....	8
<i>A két pórusdoménnal rendelkező (2P) K<sup>+</sup> csatornák elektrofiziológiai tulajdonságaik és szabályozásuk tekintetében sokfélék</i> .....	9
<i>A mellékvesekéreg glomerulóza sejt erősen negatív nyugalmi potenciáljáért döntően a háttér K<sup>+</sup> permeabilitás felelős</i> .....	13
<i>A glomerulóza sejt fiziológiás ingerei részben a sejt K<sup>+</sup> áramainak szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat</i> .....	15
<b>Célkitűzések</b> .....	<b>17</b>
<b>Módszerek</b> .....	<b>18</b>
<i>Szövetpreparálás, sejtizolálás</i> .....	18
<i>mRNS tisztítás és in vitro cRNS szintézis</i> .....	19
<i>Reverz transzkripció PCR és a termék klónozása</i> .....	19
<i>Northern blot</i> .....	21
<i>Elektrofiziológia</i> .....	21
<i>Statisztika és számítások</i> .....	22
<b>Eredmények</b> .....	<b>23</b>
1. A TASK-1 K <sup>+</sup> csatorna mRNS nagy mennyiségben expresszálódik patkány mellékvese glomerulóza sejtben .....	23
2. Az afrikai karmosbéka petesejt alkalmas a glomerulóza és a TASK-1 háttér K <sup>+</sup> áramok összehasonlítására.....	26
3. A glomerulóza és TASK-1 háttér K <sup>+</sup> áramok farmakológiai tulajdonságai hasonlóak .....	28
4. A TASK antiszenz oligonukleotid meggátolja a glomerulóza mRNS injektálásával kifejezett áramot, azonban a glomerulóza háttér K <sup>+</sup> áram a TASK-1 csatornánál kevésbé pH érzékeny .....	31

## Eredmények (folytatás)

5. Az angiotenzin II gátolja a glomerulóza háttér $K^+$ áramot és a TASK-1 csatornát .....	32
6. Az $M_1$ muszkarinos acetilkolin, a lizofoszfátid sav és kisebb mértékben az EGF receptor is képes TASK-1 gátlást létrehozni .....	36
7. A TASK-1 gátlásért a foszfolipáz C aktiváció felelős .....	38
<i>A TASK-1 gátlás kialakításában G fehérje szerepel</i> .....	38
<i>A foszfolipáz C aktiváció a TASK-1 gátlás szükséges és elégséges feltétele</i> .....	39
<i>A TASK-1 gátlást nem a citoplazma <math>[Ca^{2+}]</math> emelkedése, nem az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (<math>IP_3</math>), nem protein kináz C aktiválódás és nem tirozin kináz hozza létre</i> .....	40
<i>Magas koncentrációjú wortmannin gátolja a TASK-1 csatornát</i> .....	44
<b>Megbeszélés</b> .....	<b>46</b>
<b>Következtetések</b> .....	<b>56</b>
<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>57</b>
<b>Irodalomjegyzék</b> .....	<b>58</b>
<b>Saját közlemények</b> .....	<b>65</b>

## Összefoglaló

A mellékvesekéreg glomerulóza sejt erősen negatív nyugalmi membránpotenciállal rendelkezik és membránjának feszültségváltozásai meghatározóak a sejt aldosteron termelése szempontjából. Mindezidáig azonban e nyugalmi potenciál kialakításáért felelős háttér  $K^+$  csatornákat nem azonosították molekuláris szinten. Munkánk során arra kerestünk választ, hogy a közelmúltban megismert két pórusdoménnal rendelkező  $K^+$  csatornák és ezen belül a TASK (TWIK-related acid-sensitive  $K^+$  channel) hogyan járul hozzá a glomerulóza sejt háttér  $K^+$  permeabilitásának kialakításához.

Molekuláris biológiai vizsgálataink szerint a TASK-1 nagy mennyiségben expresszálódik glomerulóza sejtekben. A glomerulóza szövetből tisztított mRNS-t afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) petesejtbe injektálva azokban háttér  $K^+$  áram fejeződött ki. Ennek tulajdonságai több szempontból megegyeztek a tiszta TASK-1 áraméval. A klasszikus  $K^+$  csatorna gátlószerek, a tetraetil-ammónium (3 mM) és 4-aminopiridin (3 mM) nem gátolták egyik áramot sem. A lidokain (1 mM) enhye gátlást okozott. A két áram  $Ba^{2+}$  és  $Cs^+$  feszültségfüggő gátlásának koncentráció-, feszültség- és időfüggése jól egyezett. A glomerulóza mRNS-sel injektált petesejtben a  $K^+$  áram kifejeződését a TASK antiszenz oligonukleotid kivédte, de a szenz nem. A két áram pH érzékenysége viszont lényegesen eltért. Ez alapján az erősen savanyítás érzékeny TASK-1 maximum 25-30 %-át adhatja a kevésbé pH érzékeny glomerulóza áramnak, azonban a fennmaradó glomerulóza háttér  $K^+$  áram is nagyon hasonló a TASK-1 áramhoz.

Az angiotenzin II  $AT_{1a}$  receptorán keresztül gátolja a glomerulóza háttér  $K^+$  áramot és a *Xenopus* petesejtben kifejezett TASK-1 csatornát egyaránt. Ez arra utal, hogy a TASK-1 részt vesz a peptid depolarizáló és ezen keresztül hormontermelés fokozó hatásában. Petesejtben a TASK-1 csatornát a  $Ca^{2+}$ -mobilizáló lizofoszfátidsav és az  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptoron keresztül a carbachol is gátolja. A gátlást foszfolipáz C aktiváció hozza létre. Mivel a foszfolipáz C termékei nem gátolják a TASK-1 áramot, valószínűleg a membrán polifoszfoinozítid szintje szabályozza a TASK-1 csatorna aktivitását.

## Summary

Adrenal glomerulosa cells have markedly negative resting membrane potential, and the alteration of this potential is a determining factor of aldosterone production. However, the background  $K^+$  channels responsible for the resting membrane potential have not yet been identified. Therefore, in the present study we investigated the role of the recently described two-pore-domain (2P)  $K^+$  channel, TASK (TWIK-related acid-sensitive  $K^+$  channel) in the generation of glomerulosa background  $K^+$  permeability.

Our molecular biological experiments demonstrate that TASK-1 is highly expressed in glomerulosa cells. Injection of mRNA purified from glomerulosa tissue resulted in the expression of background  $K^+$  current in *Xenopus laevis* oocytes. In many respect the properties of this current were identical to the pure TASK-1 current. The classic  $K^+$  channel blockers, tetraethylammonium (3 mM) and 4-aminopyridine (3 mM) did not inhibit either current. Lidocaine (1 mM) caused a slight inhibition. Concentration- and time-dependence of the voltage-dependent inhibition of both currents by  $Ba^{2+}$  and  $Cs^+$  were identical. The TASK antisense oligonucleotide prevented the expression of  $K^+$  current in oocytes injected with glomerulosa mRNA, but the sense did not. On the other hand, the pH sensitivity of the currents was significantly different. Thus the strongly acidification sensitive TASK-1 may contribute to the less pH sensitive glomerulosa current only by 25-30 %, however, the remaining part of the glomerulosa current is very similar to TASK-1.

Angiotensin II, through its  $AT_{1a}$  receptor, inhibited the glomerulosa background  $K^+$  current and also the TASK-1 channel expressed in *Xenopus* oocytes. This suggests that TASK-1 is involved in the depolarizing and hormone secretory effect of the peptide. In the oocytes TASK-1 was inhibited also by the  $Ca^{2+}$ -mobilizing lysophosphatidic acid and stimulation of  $M_1$  muscarinic receptors. The inhibition was related to phospholipase C activation. Since the products of phospholipase C did not have inhibitory effect, presumably the activity of TASK-1 is controlled by the membrane polyphosphoinositide levels.

## Bevezetés

A sejtmembrán nagy nyugalmi  $K^+$  vezetőképessége és az ezért felelős háttér (csurgó, leak)  $K^+$  áram mintegy fél évszázada ismert, az ioncsatorna fogalommal egyidős. Édekes módon azonban a közelmúltig nem sikerült megtalálni e fontos és a természetben oly általánosan elterjedt membrántulajdonságnak a molekuláris hátterét. Az áttörés a kilencvenes évek második felében következett be, amikor az első emlős két pórusdoménnel rendelkező (2P)  $K^+$  csatornát megklónozták. Azóta a 2P csatornák családja robbanásszerűen bővül, az ismert gének száma már meghaladta az egyéb (egy pórusdoménnel rendelkező)  $K^+$  csatornákét. A 2P csatornák mesterséges kifejezése különféle sejttypusokban háttér  $K^+$  áramot eredményez. Ezen áramok vizsgálata tette lehetővé, hogy számos elektrofiziológiával meghatározott, de molekuláris szinten korábban nem definiált háttér  $K^+$  áramhoz 2P  $K^+$  csatornákat lehetett rendelni.

A 2P csatornák árama, a háttér  $K^+$  áram, membrán depolarizáció hatására pillanatszerűen növekszik a feszültség által meghatározott értékre, és az adott fenntartott feszültség mellett további változást már nem mutat. Az aktivációs és inaktivációs kinetika hiányán kívül a háttér  $K^+$  áram másik meghatározó sajátossága, hogy a csatorna ellentétes, egyenlő nagyságú hajtóerő esetén a sejtbe, illetve a sejtől hasonló nagyságú áramot vezet. Ezek a csurgó csatorna tulajdonságok (melyek a háttér  $K^+$  csatornákat a többi  $K^+$  csatornától elkülönítik) nem jelentik azonban azt, hogy a 2P csatornák csupán passzív  $K^+$  szelektív pórusok lennének a sejtmembránban. Egy adott feszültségen ugyanis az áram amplitúdóját meglepően sokféle egyéb, a feszültségtől független, az élettani működés szempontjából lényeges tényező befolyásolja. Ezek a tényezők lehetnek egyszerű fizikai vagy kémiai természetűek (például mechanikai hatás vagy pH változás), de több 2P csatornát ennél összetettebb intracelluláris jelátviteli utak is szabályoznak.

A 2P csatorna gének száma, a 2P családban megfigyelhető, a  $K^+$  csatorna családok között egyedülálló aminosav szekvencia heterogenitás és a szabályozás lenyűgöző sokfélesége a 2P csatornák szervezetben betöltött jelentős, bár ma még nem minden részletében felderített szerepére utalnak. A 2P csatornákon keresztül tartósan kifelé áramló  $K^+$  a sejt belsejét negatívabbá teszi, és ez a negatívabb membránpotenciál

közvetlen vagy közvetett módon hajtóerőként szolgál a sejt létfontosságú transzport folyamataihoz. Ezen túlmenően a sejt membránjának feszültségváltozásait hírközlési eszközként használja, mind az egy sejten belüli, mind a sejtek közötti információátadásban, és a membránpotenciált minden értékén hatékonyan befolyásoló 2P csatornák alakítják ezt az információátadást.

Vizsgálatunk tárgyául a mellékvese glomerulóza sejt háttér  $K^+$  áramait választottuk. A glomerulóza sejt nyugalmi membránpotenciálja erősen negatív, melyért döntően a membrán nagy  $K^+$  vezetőképessége felelős. A nagy nyugalmi  $K^+$  permeabilitást kialakító csatornák azonban nem voltak ismertek. A rendelkezésre álló elektrofiziológiai és farmakológiai adatok arra utaltak, hogy ezeket a csatornákat nem a klasszikus  $K^+$  csatorna családokban kell keresnünk és áramuk háttér  $K^+$  áram jelleget mutat. Ezért a 2P csatornák esélyes jelöltek voltak a glomerulóza háttér  $K^+$  áram kialakítására.

A glomerulóza sejt a fiziológias tartományban érzékeli az extracelluláris  $K^+$  koncentrációt. Már 0.5-1 mM koncentráció emelkedés fokozott aldoszteron termelést okoz. Az angiotenzin II, a glomerulóza sejt másik fő fiziológias ingere, hormontermelés fokozó hatását részben depolarizáción keresztül, a háttér  $K^+$  permeabilitás gátlásával fejtí ki. Mindezek ismeretében úgy éreztük, hogy a glomerulóza háttér  $K^+$  csatornák azonosítása és szabályozásuk kutatása közelebb vezet a glomerulóza sejtek molekuláris élettanának megértéséhez.

## Irodalmi háttér

### *A $K^+$ csatornák szerepe a nyugalmi potenciál kialakításában*

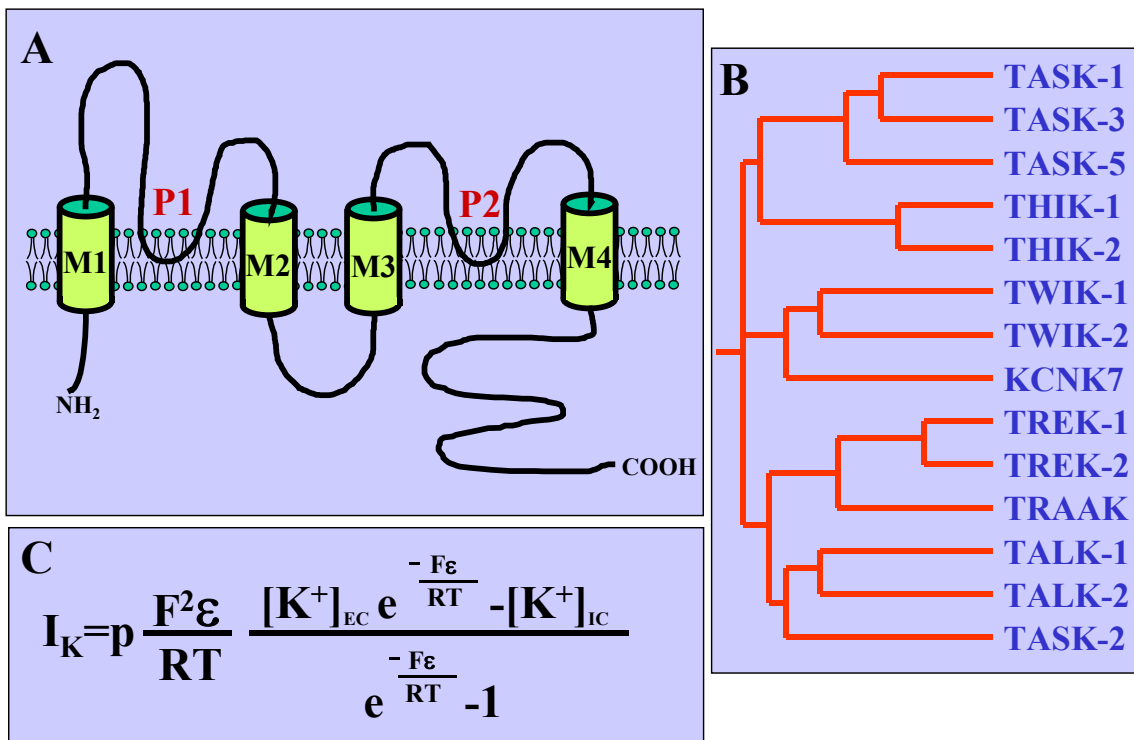
Az eukarióták ma ismert  $K^+$  csatornáinak döntő többsége szerkezetileg három nagy csoportba osztható. A legrégebben ismert feszültségfüggő és a  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatornák pórusképző alegységei hat transzmembrán szegmenssel (TMS) és egy (az 5. és 6. TMS között elhelyezkedő) pórusképző doménal (P) rendelkeznek. A 6TMS/1P csatornák pórusképző alegységei tetramert hoznak létre, ami megfelel annak, hogy minden ismert  $K^+$  csatorna ionszelektivitási filterét négy, az extracelluláris tér irányából a pórusba nyúló pórusképző domén alkotja. A 6TMS/1P csatornák a sejtek ingerelt állapotában aktiválódnak, hiszen a feszültségfüggő  $K^+$  csatornákat a depolarizáció, a  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatornákat pedig az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedése nyitja. Ezért az ezeken a csatornákon keresztül kiáramló  $K^+$  hiperpolarizáló hatása a sejtek nyugalmi állapotba való visszatérését segíti elő, az igen negatív nyugalmi membránpotenciál fenntartásában a 6TMS/1P csatornák típusosan nem szerepelnek.

Erősen negatív membránpotenciálon is tartósan aktívak viszont a befelé rektifikáló  $K^+$  csatornák. A befelé rektifikáló  $K^+$  csatornák családjára két TMS, és a közöttük elhelyezkedő pórusdomén jellemző (2TMS/1P). Alegységenként ezek is egy pórusdomént tartalmaznak, tehát a befelé rektifikáló  $K^+$  csatorna pórusképző alegységek is tetramerek formájában működnek. A befelé rektifikáló csatornák egyenirányítanak, kifelé irányuló áramukat a belülről a pórusukba ékelődő  $Mg^{2+}$  és poliaminok gátolják. Ezért fiziológias ionkoncentrációk (és kellő csatornasűrűség) esetén e csatornák a membránpotenciált erősen negatív nyugalmi értékén stabilizálják (a  $K^+$  egyensúlyi potenciálnál csak kissé pozitívabb membránpotenciálon rajtuk kifelé folyó áram miatt). A sejt aktivált állapotában azonban, erősebben depolarizált membrán esetén (mikor a pozitív töltésű  $Mg^{2+}$  a csatornák többségét eltömeszeli) nem befolyásolják lényegileg a membránpotenciált.

Számos erősen negatív membránpotenciálú sejtnek azonban nincsenek befelé rektifikáló  $K^+$  csatornáik, bennük a nyugalmi  $K^+$  permeabilitást a két pórusdoménal rendelkező (2P) háttér  $K^+$  csatornák alakítják ki (ld. a (36) és (23) összefoglalókat). A 2P csatorna pórusképző alegységekben 4 TMS található, az első P domén az 1. és 2.



TMS, a második a 3. és 4. TMS között helyezkedik el (4TMS/2P, 1. ábra, A). Eszerint várható, és kísérleti eredmények is igazolják, hogy a 2P csatornák dimerként működnek (37;40). A 2P csatornák minden feszültségen aktívak, depolarizáció esetén a nagy hajtóerőnek megfelelően nagy  $K^+$  áram folyik rajtuk, így nemcsak a negatív nyugalmi potenciál fenntartásában vesznek részt, hanem erőteljesen repolarizálnak is.



1. ábra A 2P  $K^+$  csatornák topológiája (A), filogenetikai fája (B) és a  $K^+$  szelektív pórus működését leíró GHK (Goldmann-Hodgkin-Katz) áramegyenlet (C)

(A) M1-M4: transzmembrán régiók; P1 és P2:  $K^+$  csatorna pórusdomének egy alegységben. (B) A nagyobb szekvencia hasonlóságot mutató alegységek a fa közelebbi ágain találhatóak. (C)  $I_K$ :  $K^+$  áram; p:  $K^+$  permeabilitás;  $\epsilon$ : membránpotenciál; F: Faraday-állandó; R: általános gázállandó; T: abszolút hőmérséklet (Az eredeti egyenlet a jelenleg érvényes megállapodásoknak megfelelően átalakítva.)

*A két pórusdoménnal rendelkező (2P)  $K^+$  csatornák elektrofiziológiai tulajdonságaik és szabályozásuk tekintetében sokfélék*

A 2P családhoz tartozást a jellegzetes (4TMS/2P) szerkezet definiálja. A család tagjai (1. ábra, B) aminosav szekvencia szerint nagyon eltérőek lehetnek, ezért célszerű a közelebbi rokonokat alosztályokba osztani, melyekben a csatorna tulajdonságok is hasonlóbbak. Az első emlős 2P csatornát számítógépes kereséssel találták meg nukleotid-szekvencia adatbankban (mivel hasonlított már ismert 1P  $K^+$  csatornához),

majd az innen nyert információt felhasználva klónozták meg a TWIK-1 (Tandem of pore domains in a **W**eakly **I**nwardly rectifying **K**<sup>+</sup> channel, KCNK1) csatornát (35). A leginkább ehhez hasonlító azóta klónozott csatornákat a TWIK alosztályba soroljuk, ilyenek a TWIK-2 (KCNK6 (12)), illetve az expresszáva működésképtelen KCNK7 (65) és KCNK8 (4) pórusképző alegységek. A TWIK csatornákat az intracelluláris pH csökkenése gátolja, a protein kináz C általi foszforiláció serkenti.

A TREK (**T**WIK **R**elated **K**<sup>+</sup> channel) alosztály tagjai, a TREK-1 (KCNK2, (20)), TREK-2 (KCNK10, (2;38)) és TRAAK (**T**WIK-**R**elated **A**rachidonic **A**cid-stimulated **K**<sup>+</sup> channel, KCNK4 (21)) mechanoszenzitív K<sup>+</sup> csatornák. A membránfeszülésen kívül a TREK csatornákat serkenti az arachidonsav és egyéb telítetlen zsírsavak, illetve a lizofoszfolipidek (2;21;46;47). Az intracelluláris pH szabályozza a TREK csatornákat is, azonban a TWIK-kel ellentétesen, a savanyítás aktivál (38;47). A TREK-1 az egyéb K<sup>+</sup> csatornáknál jóval meredekebb aktivációt mutat a hőmérséklet emelésére. Ez a tulajdonság a perifériás érző neuronokban és a hipotalamusz hőszabályozó központjában kaphat élettani szerepet (45). A TREK áramokat szignáltranszdukciós folyamatok is szabályozzák. A TREK-1 csatornát a protein kináz A foszforiláció gátolja. Ennek a szabályozásnak fontos szerepe van például az *Aplysia* tengeri csiga egyszerűbb tanulási folyamataiért felelős idegsejt-hálózataiban, ahol az S-típusú háttér K<sup>+</sup> áramot, melyet TREK csatorna hoz létre (53), a facilitáló interneuronok szerotonin neurotranszmittere cAMP szint emelésén keresztül gátolja (7;31). A TREK-2 csatornát a cAMP szintet emelő, illetve csökkentő G<sub>s</sub>, illetve G<sub>i</sub> fehérjéken kívül a G<sub>q</sub> heterotrimer G fehérje aktiválódása is szabályozza, gátolja (38).

A 2P csatornák egy része erősen érzékeny az extracelluláris pH-ra. Az ide tartozó csatornákat két további csoportra lehet osztani aminosav-szekvencia hasonlóság szerint. A TALK (**T**WIK-related **A**Lkaline pH activated **K**<sup>+</sup> channel) alosztályba tartoznak a TALK-1 (KCNK16 (22)), TALK-2 (22) (más néven TASK-4, KCNK17 (15)) és TASK-2 (KCNK5 (62)) csatornák. A hasonló elnevezések ellenére külön csoportba, a TASK (**T**WIK-related **A**cid-Sensitive **K**<sup>+</sup> channel) alosztályba, tartozik a TASK-1 (régebbi nevén TASK, KCNK3 (16;34)), illetve a közelmúltban, munkánkkal párhuzamosan megklónozott TASK-3 (KCNK9, (30;61)) és TASK-5 (KCNK15 (29), 2. ábra). A TASK-3 csatorna extracelluláris savanyításra bekövetkező gátlását a 98-as

<b>TMS-1</b>		
TASK-1	MKRQNVRTLALIVCTFTYLLVGA AVFDALESEPELIERQRLELRQQELRA	50
TASK-3	MKRQNVRTL SLIVCTFTYLLVGA AVFDALES DHEMREEEKLK AEEIRIKG	50
TASK-5	MRRPSVRAAGLVLCTLCYLLVGA AVFDALESEAESGRQLLVQKRGALRR	50
	M R VR L CT YLLVGA AVFDALES E L	
<b>P1</b>		
TASK-1	RYNLSQGGYEELERVVLR LKPHKAGVQWR FAGSFYFAITVIT TIGYGHAA	100
TASK-3	KYNISSE DYRQLELVILQSEPHRAGVQWK FAGSFYFAITVIT TIGYGHAA	100
TASK-5	KFGFSAEDYRELERLALQAEPHRAGRQWK FPGSFYFAITVIT TIGYGHAA	100
	S Y LE L PH AG QW F GSFYFAITVIT TIGYGHAA	
<b>TMS-2</b>		
TASK-1	PSTDGGKVF CMFYALLGIPLTLVMFQSLGERINTLVRYLLHRAKKGLGMR	150
TASK-3	PGTDAGKAF CMFYAVLGIPLTLVMFQSLGERMNTFVRYLLKRIKKCCGMR	150
TASK-5	PGTDSGKVF CMFYALLGIPLTLVTFQSLGERLNAVVRRLLLA AKCCLGLR	150
	P TD GK FCMFYA LGIPLTLV FQSLGER N VR LL K G R	
<b>TMS-3</b>		
TASK-1	RADVSMANMV LIGFFSCISTLCIGAAAF SHYEHWTFFQAYYYCFITLTTI	200
TASK-3	NTDVSMENMVT VGGFFSCMGTLCIGAAAF SQCEEWSFFHAYYYCFITLTTI	200
TASK-5	WTCVSTENLVVAGLLACAATLALGAVAF SHFEGWTFHAYYYCFITLTTI	200
	VS N V G C TL GA AFS E W FF AYYYCFITLTTI	
<b>TMS-4</b>		
TASK-1	GFGDYVALQKDQALQTPQYVAFS FVYILTGLTVIGAFNLVVLRFMTNA	250
TASK-3	GFGDYVALQTKGALQKKPLYVAFS FMYILVGLTVIGAFNLVVLRFMTN	250
TASK-5	GFGDFVALQSGEALQRKLPYVAFS FLYILLGLTVIGAFNLVVLRFVLVA	250
	GFGD VALQ ALQ YVAFSF YIL GLTVIGAFNLVVLRF	
TASK-1	EDEKRDAEHRALLTRNGQAGGGGGGSAHTTDTASSTAAAGGGFRNVYY	300
TASK-3	SEDERRDAEERASLAGNRNS-----MVIHIPEEPRPSRPR-----YK	287
TASK-5	ADWPERAAR-----PPSPRPPGAP-----	269
TASK-1	AEVLHFQSMCSC LWYKSREK LQYSIPMIIPRDLSTSDTCVEQSHSSPGGG	350
TASK-3	ADV PDLQSVCSCTCYRSQD---YGGRSVAPQNSFSAKLAPHYFHSISYKI	334
TASK-5	-----ESRGLWLP RRP-----ARVGSASV FCHVHKLERCAR	301
TASK-1	GRYSDTPSRRCLCSGAPRSAISSVSTGLHSLSTFRGLMKRRSSV	394
TASK-3	EEISPSTLKNSLFP----SPISSISPGLHSFTDHQRLMKRRKSV	374
TASK-5	DNLGFSPPS-----SPGVVRGGQAPRPGARW KSI	330
	S G R S	

## 2. ábra A TASK-1, TASK-3 és TASK-5 2P K<sup>+</sup> csatornák aminosav szekvenciáinak összehasonlítása

A szekvenciák összehasonlítását a ClustalW program segítségével végeztük. A hosszú vízszintes vonalak alatt a konszenzus szekvenciát tüntettük fel, mely a mindhárom csatornában konzervált aminosavakat mutatja. Az aminosavak színekódolása a következő: kék: savanyú, fekete: bázikus, zöld: semleges, piros: hidrofób. TMS1-4: transzmembrán régiók, P1-2: pórusdomének.

pozícióban elhelyezkedő hisztidin protonálódása váltja ki (61). Ez a hisztidin konzervált a TASK-1 és TASK-5 csatornában (de nem a távoli rokon, szintén pH érzékeny TASK-2 és TASK-4-ben). Szemben a TASK-1 és TASK-3 csatornákkal a TASK-5 kifejezése nem eredményez  $K^+$  áramot heterolog expressziós rendszerben, COS sejtekben (29).

A 2P  $K^+$  csatornák többségének működését a párolgó folyadék anesztetikumok befolyásolják (51). A TREK-1 és TREK-2 áramot a kloroform, az éter, a halotán és az izoflurán egyaránt jelentősen aktiválja a klinikailag hatásos koncentrációban (38;52). A TASK-1 csatorna működését a halotán és az izoflurán serkenti, a kloroform nem hat rá, az éter pedig gátolja (52;68). Vannak olyan 2P csatornák is, melyeket a halotán gátol (pl. TWIK-2 (54), TALK-2 (15)). Erről a tulajdonságáról kapta nevét a THIK (Tandem pore domain Halothane Inhibited  $K^+$  channel) alosztály, melybe az arachidonsavval aktiválható THIK-1 (KCNK13) és a THIK-2 (KCNK12) tartozik (60). A THIK-2 bár kijut a plazmamembránba, ott nem képez működő  $K^+$  csatornát, még a THIK-1 alegység koexpressziója esetén sem (60).

Csatorna	EC pH6.4	IC pH↓	AA (10 $\mu$ M)	Protein kináz	Halotán	Egyéb
TASK-1	↓ (-95 %)	↓ (?)	↓ (-45 %)	PK A ↓ (csak patkány)	↑	bupivakain ↓
TASK-3	↓ (-74 %)	-	↓ (-59 %)	-	?	
TASK-5						nem expr.
THIK-1	-	-	↑ (+90 %)	?	↓	
THIK-2						nem expr.
TWIK-1	?	↓	?	PK C ↑	?	
TWIK-2	-	↓	↑ (+76 %)	PK C ↑	↓	inaktiválódik
KCNK7						nem expr.
TREK-1	-	↑	↑↑ (+430%)	PK A ↓ PK C ↓	↑↑	mechanoszenzitív hőmérséklet ↑↑
TREK-2	?	↑	↑↑ (+840%)	PK A ↓	↑↑	mechanoszenzitív mGluR1 ( $G_q$ ) ↓
TRAAK	-	-	↑↑ (+630%)	-	-	mechanoszenzitív
TASK-2	↓ (-95 %)	↓	-	?	↑	
TALK-1	↓ (-50 %)	-	-	-	↓	
TALK-2	-	-	-	-	↓	=TASK-4

### 1. táblázat A 2P $K^+$ csatornák szabályozása

A táblázat fejlécében ↓: csökkenés, egyébként ↓:gátlás, ↑: serkentés, -: nem befolyásol, ?: nem ismert vagy ellentmondó adatok. Az alkalmazott rövidítések: EC pH6.4: az extracelluláris pH 7.4-ről 6.4-re változtatása; IC: intracelluláris; AA: arachidonsav; PK A: protein kináz A; PK C: protein kináz C; nem expr.: nem expresszálódik; mGluR1: metabotrop glutamát receptor 1;  $G_q$ :  $G_q$  heterotrimer G fehérje

A fenti példákból látható, hogy a 2P csatornák szabályozása és farmakológiai tulajdonságai változatosak. A 2P  $K^+$  csatornák a 4TMS/2P szerkezeten kívül azonban mutatnak még közös vonásokat. Az egyes 2P  $K^+$  csatornáknál a feszültség beállítás során (voltage clamp) egy adott membránpotenciál értékhez egy adott  $K^+$  áram nagyság tartozik, mivel a 2P  $K^+$  áramok egy adott feszültségen (kontroll körülmények között) időben nem változnak, aktivációs, illetve inaktivációs kinetikát nem mutatnak. (Ez alól a szabály alól kivétel a TWIK-2, mely inaktiválódó  $K^+$  áramot hoz létre (54), illetve a nemrégiben közölt megdöbbentő TREK-1 foszforilációs szabályozás (5), mely során a TREK-1 átalakul háttér  $K^+$  csatornából feszültségfüggővé.)

Egyes 2P csatornákra (pl. TASK-1 (16) és TRAAK (44)) még ennél is általánosabb törvény érvényes. Az általuk létrehozott  $K^+$  permeabilitás a feszültségtől független, konstans értéket mutat, ezért a  $K^+$  áramuk pontosan megfelel az 50-es években Goldman, Hodgkin és Katz által megjósolt és pontosan kiszámított, állandó permeabilitású  $K^+$  szelektív pórusénak (1. ábra, C). Az ezen  $K^+$  csatornákra jellemző makroszkópos feszültség-áram összefüggés, a membrán két oldalán egyenlő  $[K^+]$  esetén, egy origón átmenő egyenes, és fiziológiai körülmények között a nagyobb kifelé irányuló áram csupán a membrán két oldalán található egyenlőtlen  $[K^+]$  megoszlás miatt jelentkezik.

*A mellékvese kéreg glomerulóza sejtek erősen negatív nyugalmi potenciáljáért döntően a háttér  $K^+$  permeabilitás felelős*

A glomerulóza sejtek rendkívüli érzékenysége az extracelluláris  $K^+$  koncentráció változásaira, a sejt erősen negatív membránpotenciálja és a fiziológiai ingerek hatására bekövetkező membránpotenciál változások számos kutatót sarkalltak a sejt  $K^+$  csatornáinak tanulmányozására. A glomerulóza sejtmembrán elektromos tulajdonságainak első részletes vizsgálatát Quinn és munkatársai végezték (58;59). Eredményeik szerint nyugalmi körülmények között a glomerulóza sejt membránja 50-100-szor permeabilisabb  $K^+$ -ra, mint  $Na^+$ -ra, és a membránpotenciál jól közelíthető az állandó háttér  $K^+$  permeabilitással számoló Goldmann, Hodgkin, Katz (GHK) konstans

tér egyenlettel negatív feszültségeken, míg depolarizáció hatására további feszültségfüggő  $K^+$  áramok aktiválódnak.

A feszültségfüggő áramok közül a nem inaktiválódó, késői rektifikáló (delayed rectifier)  $K^+$  áramot kimutatták patkány, szarvasmarha és humán glomerulóza sejtben egyaránt (8;56). Szarvasmarha és humán sejtekben jelen volt továbbá egy gyorsan inaktiválódó, A-típusúként azonosított, feszültségfüggő  $K^+$  áram komponens is (8;56). A feszültségfüggő csatornákon kívül a glomerulóza sejt repolarizációjában a nagy vezetőképességű (BK, maxi)  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatorna is részt vesz, mely a  $Ca^{2+}$ -jel hatására és depolarizációra aktiválódik (55). A nagy vezetőképességű, charybdotoxin érzékeny  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatornát egyedi csatorna szinten (single channel) is kimutatták (41;72).

A részletesen vizsgált feszültségfüggő és  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  áramok jelenléte azonban nem magyarázza meg a sejtek erősen negatív nyugalmi potenciálját (kb. -80 mV, (41;59)). Egy tanulmány egyedi csatorna (single channel) szinten befelé rektifikáló  $K^+$  csatornákat mutatott ki glomerulóza sejtekben (72), azonban a jellegzetes  $Ba^{2+}$ -érzékeny, befelé rektifikáló makroszkópos  $K^+$  áramot a kiterjedt vizsgálatok ellenére sem közöltek e sejt típusban.

Lotshaw a makroszkópos, negatív membránpotenciálok mérhető  $K^+$  áram jellemzők alapján háttér, csurgó  $K^+$  csatornákat tett felelőssé a nagy nyugalmi  $K^+$  permeabilitásért (41). A háttér  $K^+$  áramot létrehozó csatornákat egyedi csatorna (single channel) szinten is megmérte, kis amplitúdójú és igen rövid átlagos nyitvatartási idejű (2 msec) csatorna megnyílásokat tapasztalt, mely érthetővé teszi, hogy e csatorna megnyílások miatt nem voltak korábban szembeötlőek. Ezek a csatornák fiziológiához közeli ionkoncentrációnál, depolarizációra kifelé is nagy áramot vezettek, eltérően a befelé rektifikáló csatornáktól. A sok egyedi csatorna aktivitásából összegzett áram, feszültséglépés során, pillanatszerűen változott és az adott feszültségen állandó, nem inaktiválódó áramot adott, mely jól megfelelt a teljes sejt felállásban mért tényleges háttér  $K^+$  áram tulajdonságainak. Az áramot a klasszikus  $K^+$  csatorna gátlószer, 4-aminopiridin (5 mM) nem befolyásolta és a tetraetil-ammónium is csak igen magas (30 mM) koncentrációban okozott enyhe (30 %) gátlást (41). Az erősen negatív

membránpotenciálon mérhető glomerulóza áram elektrofiziológiai és farmakológiai tulajdonságai tehát a háttér  $K^+$  csatornák meghatározó szerepére utaltak.

*A glomerulóza sejt fiziológias ingerei részben a sejt  $K^+$  áramainak szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat*

A glomerulóza sejtek legfontosabb fiziológias ingerei az angiotenzin II, a megemelkedett plazma  $K^+$  koncentráció és az adrenokortikotrop hormon, ACTH. Míg az ACTH elsősorban a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szint emelésén keresztül hat, a másik két stimulus a citoplazma  $Ca^{2+}$  koncentrációt növeli. Az angiotenzin II kötődése az  $AT_{1a}$  receptorhoz gyors foszfolipáz C aktivációt eredményez, melyet inozitol-1,4,5-triszfoszfát ( $IP_3$ ) képződés és az intracelluláris raktárból  $Ca^{2+}$  felszabadulás követ. A belső raktárból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás után, ha az angiotenzin II továbbra is jelen van, a válasz a fenntartott fázisba megy át, ilyenkor az extracelluláris térből áramlik  $Ca^{2+}$  a sejtbe. A  $Ca^{2+}$  beáramlás részben a kiürült belső raktár miatt aktiválódó kapacitatív  $Ca^{2+}$  beáramlási úton történik (10;63), jelentős hányada viszont dihidropiridin érzékeny, ami a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák részvételére utal (14;64). Az angiotenzin II depolarizálja a glomerulóza sejtet (26;59), elsősorban a sejt  $K^+$  permeabilitásának csökkentésén keresztül (13;28;41). A depolarizációt a háttér  $K^+$  áram gátlása hozza létre (13;41), fenntartásához azonban hozzájárul a feszültségfüggő (8), sőt a  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  áramok (55) gyengítése is. A depolarizáció a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák aktiválásához vezet és magyarázza az angiotenzin II hatására létrejövő  $Ca^{2+}$ -jel és aldoszteron termelés részleges érzékenységét a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatorna gátlószer dihidropiridinekre.

Míg az angiotenzin II által kiváltott  $Ca^{2+}$ -jelnek az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -raktár és az extracelluláris tér egyaránt forrása, a  $K^+$  hatására kifejlődött kizárólag a külső térből beáramló  $Ca^{2+}$  alakítja ki (1;57). Az extracelluláris  $[K^+]$  növekedése a csaknem kizárólag  $K^+$ -ra áteresztő glomerulóza sejtmembránon az elméleti, Nernst egyenlettel számítható, lehetséges maximumhoz közeli depolarizációt okoz (13). Bár az élettani körülmények között megfigyelhető egy-két mM-os  $[K^+]$  emelkedés még egy teljesen csak  $K^+$ -ra áteresztő membránt is mindössze néhány mV-tal depolarizál, a jelenleg

általánosan elfogadott elképzelés szerint, ez elég ahhoz, hogy a nyugalmi membránpotenciál környékén ‘finoman hangolt’ feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon keresztül lényegesen nagyobb mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  áramoljon a sejtbe. Glomerulóza sejtben alacsony feszültségküszöbű, inaktiválódó (T) és erősebb depolarizációra aktiválódó, nem vagy csak gyengén inaktiválódó (L) feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat mind elektrofiziológiailag (14;17;57;64;73), mind molekuláris biológiai módszerekkel (24;66) azonosítottak. E csatornák szerepe a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakításában és a szteroid termelés fokozásában széleskörben elfogadott.



## Célkitűzések

1. A glomerulóza sejt nyugalmi membránpotenciálon is aktív  $K^+$  áramait létrehozó ioncsatornák felderítése molekuláris biológiai módszerekkel. Ezen belül a két pórusdoménnal rendelkező (2P) csatornák szerepének vizsgálata.
2. Olyan heterolog expressziós rendszer beállítása, melyben a glomerulóza háttér  $K^+$  áram azonos körülmények között hasonlítható össze valamely egymagában kifejezett  $K^+$  csatorna áramával.
3. A molekuláris biológiai módszerekkel glomerulóza sejtben kimutatott, nagy mennyiségben kifejeződő 2P  $K^+$  csatorna, a TASK-1 áramának farmakológiai összehasonlítása a glomerulóza (glomerulóza sejtben, ill. heterolog expressziós rendszerben mért) árammal.
4. Annak meghatározása, hogy a TASK csatorna milyen mértékben járul hozzá a glomerulóza háttér  $K^+$  áramhoz.
5. A TASK-1 szerepének vizsgálata a glomerulóza sejtre jellemző háttér  $K^+$  áram receptor mediált szabályozásában. A 2P csatornák jelentőségének meghatározása a háttér  $K^+$  áram gátlásban, melyet a glomerulóza sejt egyik fő fiziológiás ingere, az angiotenzin II fejt ki.
6. Annak vizsgálata, hogy az angiotenzin II receptoron kívül milyen egyéb receptorok képesek TASK-1 gátlást létrehozni.
7. A  $Ca^{2+}$ -mobilizáló hormonreceptorok jelátviteli útján a TASK-1 gátlásért felelős lépés meghatározása.

## Módszerek

### *Szövetpreparálás, sejtizolálás*

A szöveteket 250-300 g-os Wistar patkányokból nyertük. A mellékvese glomerulója réteget a külső rostos tokkal együtt távolítottuk el (kapszuláris szövet). A fennmaradó rész (dekapszulált mellékvese) a faszikuláta, retikuláris rétegeket és a mellékvesevelőt tartalmazta. A glomerulóza és faszikuláta/retikuláris sejteket a szövetekből izoláltuk kollagenázos emésztéssel (19). A sejteket poli-lizinnel bevont ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Petri csészékben tartottuk módosított Krebs-Ringer-bikarbonát-glukóz és Medium 199 oldat antibiotikumokkal (100 U/ml penicillin és 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin) kiegészített 38:62 arányú keverékében ( $\text{K}^+$  3.6 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  1.2 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  0.5 mM), 37 °C-os inkubátorban, 5%  $\text{CO}_2$  légkörben. Az egy sejtől végzett reverz transzkripció PCR kísérletekhez mikroszkóppal választottunk sejteket a megfelelő sejt kultúrákból.

Benzocainnal (0.03%) érzéstelenített, felnőtt *Xenopus laevis* nőstényekből petefészek lebenyeket távolítottunk el. A lebenyeket enyhén hipozmotikus, nominálisan  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes oldatban (NaCl 82.5 mM, KCl 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, HEPES 5 mM, pH 7.5 (NaOH)) kollagenázzal (1.45 mg/ml, 148 U/mg, type I, Worthington Biochemical Corp.) emésztettük, lassan forgatott csövekben 1.5-2 óra hosszan, 18 °C-on. A lebenyt összetartó kötőszövet és a petesejteket borító follikuláris réteg fellazulása után, a kb. 1-1.2 mm átmérőjű (V. és VI. érési stádiumba tartozó) petesejtekről a follikuláris réteget manuálisan távolítottuk el. A petesejteket a továbbiakban 18 °C-on billegtetve tartottuk módosított Barth's oldatban, mely a következő összetételű volt (mM-ban) NaCl 88, KCl 1,  $\text{NaHCO}_3$  2.4,  $\text{MgSO}_4$  0.82,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.33,  $\text{CaCl}_2$  0.41, HEPES 20 (pH 7.5, NaOH), Na-piruvát 4.5, teofillin 0.5, kiegészítve penicillinnel (100 U/ml) és streptomycinnel (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). A petesejteket egy nappal a follikuláris réteg eltávolítása után injektáltuk 50 nl mRNS-sel vagy cRNS-sel egy kb. 30  $\mu\text{m}$  átmérőjű üvegapillárison át, Nanoliter Injector (World Precision Instruments) segítségével. Az antiszensz (TASK5'a: 5' CACATTCTGCCGCTTCATCGTC 3' (70  $\mu\text{M}$ , 50 nl) és kontrol szensz (TASK5's: 5' GGCATATGAAGCGGCAGAATGTGCG 3' (90  $\mu\text{M}$ , 50 nl) oligonukleotidokkal végzett kísérletekben a DNS-t egy újabb injektálás során 2-3 órával az RNS után

juttattuk a sejtbe. Az elektrofiziológiai méréseket 3-4 nappal az injektálás után végeztük.

### *mRNS tisztítás és in vitro cRNS szintézis*

Különböző patkány szövetekből guanidinium-izotiocianát/savanyú fenol/kloroform eljárással teljes RNS-t tisztítottunk. A teljes RNS túlnyomó részét alkotó riboszómális RNS-től (rRNS) az mRNS-t oligo dT-cellulóz affinitáskromatográfiával (Pharmacia vagy New England Biolabs) választottuk el. A csak az mRNS-re jellemző poliA farok és az oszlopon található csak dezoxi-timidint tartalmazó oligonukleotid erős kötődését, hibridizációját követően a nem kötődött rRNS-t lemostuk, majd a hőmérséklet emelésével és az ionerősség csökkentésével a hibridizációt megszüntettük, a tiszta mRNS-t eluáltuk. Az RNS koncentrációját 260 nm-en mért optikai denzitása alapján határoztuk meg.

A TASK-1 ioncsatornát, az AT1a angiotenzin II, az M1 és M2 muszkarinos acetilkolin és epidermális növekedési faktor (EGF) receptorokat, illetve a foszfolipáz C  $\beta$ 2-t kódoló cRNS-eket in vitro szintetizáltuk az Ambion mMESSAGE mMACHINE T7 In vitro Transcription Kitjével. A fehérjék kódoló régióját tartalmazó plazmidokat a kódoló régiót követő ponton linearizáltuk restrikciós enzim hasítással, majd a templát DNS-t proteináz K emésztéssel RNáz mentesítettük. (A kódoló régiókat tartalmazó plazmidokat a következő külföldi kutatóktól kaptuk ajándékba: Dr. Michel Lazdunski, Dr. Florian Lesage, Dr. Xin-Yun Huang, Dr. T.I. Bonner, Dr. K. E. Bernstein és Dr. Sue Goo Rhee.) Felhasználva a kódoló régió előtt elhelyezkedő T7 RNS polimeráz promotert a kit segítségével kódoló cRNS-t szintetizáltunk a templátról, majd a templát DNS-t DNáz I emésztéssel elbontottuk és a kész cRNS-t fenol/kloroform extrakcióval, majd izopropanolos kicsapással nyertük tisztán.

### *Reverz transzkripció PCR és a termék klónozása*

Taq DNS polimerázzal sokszorosítottunk specifikus TASK termékeket tipikus PCR körülményeket alkalmazva (kezdeti denaturálás (94 °C 120 sec), majd 35 ciklus

denaturálás (94°C: 30 sec), primer hibridizálás (50°C: 60 sec) és extenzió (72°C: 90 sec), melyet a végül még 5 perc extenzió követett). A templát előállításához reakciónként 1 µg glomerulóza teljes RNS-t írtunk át cDNS-sé MMLV reverz transzkriptázzal, random hexamer oligonukleotidot használva indító primerként. A TASK-1 és TWIK párhuzamos sokszorosításához a mindkét csatorna cDNS-hez hibridizálódó TASK1s (5' SYTCTWCTTCGCCAKCACCG 3'; GCG (Genetics Computer Group) nukleotid-kódrendszer szerint felírva) és TASK1a (5' CCSARGCCRATGGTGSTSAG 3') degenerált primereket használtuk. A teljes TASK-1 kódoló régiót két darabban sokszorosítottuk. Az első darabot a TASK5's-TASK1a, az ezzel átfedő második részt a TASK1s-TASK3'a primerkombinációval állítottuk elő (ahol a TASK5's a START, a TASK3'a (5' GGTTCACTGAGCTCCTGCGC 3') pedig a STOP kodon területének felelt meg). A TASK1s-TASK1a termék (primerekből származó) 5' végeit foszforiláltuk T4 polinukleotid kinázzal, majd az EcoRV restrikciós enzimmel linearizált, borjú intesztinális alkalikus foszfatázzal (CIP) defoszforilált, tompa végekkel rendelkező pBluescript KS- (Stratagene) vektorba ligáltuk T4 DNS ligázzal. A PCR termékeket, illetve az abból származó klónt a Sanger-féle didezoxinukleotid-láncterminációs módszer segítségével szekvenáltuk (Sequenase II kit, United States Biochemical Corporation).

Az egy sejtől végzett PCR kísérleteknél (a megfelelő tenyészetből) kiválasztott glomerulóza vagy faszikuláta/retikuláris sejtet steril, letört végű, a patch clamp kísérleteknél is használt mikropapillárisba szippantottuk, majd lefagyasztottuk. A reverz transzkripció reakcióba templátként a sejtet tartalmazó kapilláris véget törtük bele. Két egymást követő PCR reakciót alkalmaztunk, oly módon, hogy a másodikban használt oligonukleotidok az elsőben keletkezett termék első primerektől eltérő, belső szekvenciáihoz hibridizálódnak (nested PCR). Ezáltal különösen nagy sokszorosítást és magas specificitást érhetünk el. Az első reakcióban a TASK1s és 5' TCCTTCTGCAGCGCCACGTA 3', a másodikban az 5' ACGGACGGAGGCAAGGTGTT 3' és TASK1a primereket használtuk. Kontrollként a sejt kultúra sejtmentes médiumával, illetve reverz transzkripció nélkül sejtekből végeztünk RT-PCR kísérletet.

## *Northern blot*

A különböző szövetek teljes RNS-eiből 10-10 µg-ot futtattunk denaturáló, formaldehides 1%-os agaróz gélen. Az elektroforetikus szétválasztást követően diffúziós módszerrel Hybond nylon membránra vittük át az RNS-t. Erős ultraibolya fényel keresztköttük a membránhoz, előhibridizáltuk szonikált lazac sperma DNS-sel az aspecifikus kötőhelyek telítésére, majd egy éjszakán át 42 °C-on forgatva hibridizáltuk valamely radioaktív TASK-1 szondánkkal. Kétféle szondát alkalmaztunk, az egyik templátja a patkány mellékveséből sokszorosított TASK1s-TASK1a PCR termék volt (360 bp), a másiké a humán TASK-1 cDNS PstI-SacI darabja (212 bp), mely utóbbi a csatorna C-terminálisát kódoló területnek felel meg. A [<sup>32</sup>P]dCTP-vel jelölt szondákat a DNS polimeráz I Klenow fragmentjével, random hexanukleotid primerekkel írtuk át a templátokról. A hibridizálást követően a nem specifikusan kötődő szondát az ionerősség csökkentésével, és a hőmérséklet emelésével távolítottuk el a membránról többszöri mosás során. A membrán radioaktivitását, a TASK-1 jeleket, Phosphorimagerrel (GS-525, BioRad) képeztük le kvantitatívan. Végül a membránról 100 °C-on leolvastottuk a TASK-1 szondát, és a fenti eljáráshoz hasonló módon egy minden szövetben hozzátétőlegesen egyenlően expresszálódó enzimnek, a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáznak (GAPDH) megfelelő szondát hibridizáltunk hozzá; ezáltal egy az RNS mennyiségére jellemző belső standard értéket határoztunk meg. A különböző szövetekben a TASK-1 expresszió mértékét erre az értékre normalizálva számoltuk ki.

## *Elektrofiziológia*

A glomerulóza patch clamp méréseket teljes sejt felállásban végeztük. Az extracelluláris (EC) oldat összetétele a következő volt mM-ban: NaCl 137, KCl 3.6, MgCl<sub>2</sub> 0.5, CaCl<sub>2</sub> 2, glucose 11, HEPES 10, PIPES 3.3 (pH 7.4 vagy 6.7 (NaOH)). Az emelt (30 mM) K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatban a megfelelő mennyiségű Na<sup>+</sup>-t K<sup>+</sup>-mal helyettesítettük. Az intracelluláris (IC) oldat mM-ban tartalmazott: KCl 135, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 0.05, EGTA 1 (a számított szabad Ca<sup>2+</sup> koncentráció 20 nM volt), Na-ATP 2,

HEPES 10, pH 7.3 (KOH). A mérőpipettákat boroszilikát üvegből (GC120TF-10) húztuk P-87 pipettahúzó készülékkel (Sutter Instruments), majd a hegyüket további hőkezeléssel simábbá tettük, így az ellenállásuk (IC oldattal töltve) 4-6 M $\Omega$  volt. A membrán és a pipettahegy között kialakított összetapadás (seal) ellenállása a sikeres mérések kezdetén (cell-attached) kb. 10 G $\Omega$  értéket adott. A feszültség clampet Axopatch-1D (Axon Instruments) vagy RK-400 (Biological) erősítővel valósítottuk meg.

A *Xenopus* oocyták áramait két elektródos feszültség clamp módszerrel mértük (OC-725C erősítő, Warner Instruments). Az EC oldat 2 vagy 80 mM [K<sup>+</sup>]-t tartalmazott (a [K<sup>+</sup>] és [Na<sup>+</sup>] összege állandó volt: 97.4 mM, az egyéb összetevők mM-ban CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 5 voltak, pH 7.5 vagy 6.7-re pufferelve (NaOH). A boroszilikát üvegből húzott intracelluláris mikroelektródok 0.3-3 M $\Omega$  ellenállást mutattak, mikor 3 M KCl-dal töltöttük őket. Az elektrofiziológiai méréseinkből nyert adatokat Digidata 1200 analóg-digitális átalakítón keresztül juttattuk személyi számítógépre, melyen a pClamp 6.04 szoftvercsomag komponenseivel regisztráltuk és értékeltük ki őket. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük, és az EC oldatot hidrosztatikai nyomáskülönbséget kihasználó perfúziós rendszerrel cseréltük a sejtjeink körül.

### *Statisztika és számítások*

Adataink szórását az átlag hibája formájában (SEM) adtuk meg. A különbségek statisztikai kiértékelését törekedtünk a kísérleti modellnek leginkább megfelelő teszttel végezni a STATISTICA programcsomag segítségével. A következő tesztek kerültek alkalmazásra: a nem-paraméteres Mann-Whitney U teszt és Fischer exact teszt, kétmintás t-próba, egyszempontos (one-way) és kétszempontos (2-way, repeated-measures) ANOVA. A különbségeket  $p < 0.05$  esetben tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

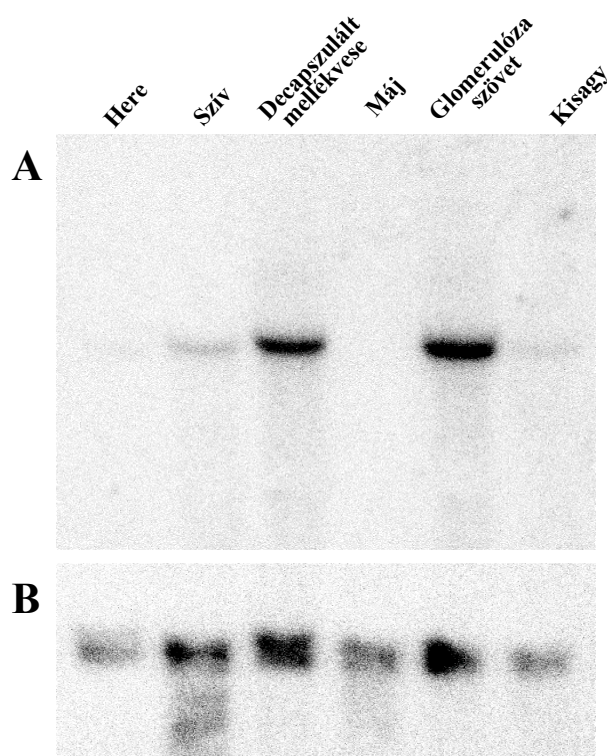
### 1. A TASK-1 K<sup>+</sup> csatorna mRNS nagy mennyiségben expresszálódik patkány mellékvese glomerulóza sejtekben

A két pórusdoménal rendelkező TWIK-1 és TASK-1 K<sup>+</sup> csatornák kifejeződésének vizsgálatára degenerált oligonukleotidokat terveztünk (TASK1s és TASK1a), melyek a csatorna cDNS-ek erősen konzervált régióihoz hibridizálnak. A primerekkel reverz transzkripciós polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) terméket sokszorosítottunk glomerulóza teljes RNS-ből. A termék restrikciós emésztése a TASK-1 csatornára specifikus KpnI enzimmal azt mutatta, hogy a termék gyakorlatilag teljes egészében TASK-1 eredetű. A terméket klónoztuk és megszekvenáltuk. Az így nyert bázissorrend megegyezett a patkány kisagyból klónozott TASK-1 (34) szekvenciájával. Kiváncsiak voltunk, vajon a glomerulóza sejtben kifejeződő TASK-1 teljes kódoló régiója megegyezik-e a kisagyból klónozott TASK-1-ével, ezért a kódoló régiót két egymással átfedő DNS darab formájában sokszorosítottuk és e termékek szekvenciáját is meghatároztuk. A TASK5's-TASK1a és TASK1s-TASK3'a RT-PCR termékek szekvenciája is megegyezett a közölt patkány kódoló régióéval.

Hogy képet kapjunk a TASK-1 expresszió mértékéről a glomerulóza szövetben, azt Northern blottal egyéb szövetek expressziós szintjéhez hasonlítottuk. Szondaként négy esetben a klónozott TASK1s-TASK1a PCR terméket használtuk. Ellenőrzésképpen egy esetben a humán TASK-1 (16) egyedi C-terminálisának megfelelő szondát alkalmaztunk, mely ugyanazt az eredményt adta, mint a TASK1s-TASK1a szondával végzett kísérletek.

A TASK-1 mRNS körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben volt jelen a mellékvesében, mint a csatorna addig bő forrásának tekintett kisagyban és szívben (3. ábra). A különböző vizsgált szövetekben a GAPDH-ra normalizált TASK-1 jelek a következőnek adódtak, ha a glomerulóza szövet jelét tekintjük egységnyinek: glomerulóza szövet (1); dekapszulált mellékvese ( $0.52 \pm 0.07$ ); kisagy ( $0.08 \pm 0.03$ ); szív pitvar ( $0.07 \pm 0.01$ ); máj és agy 0.05 alatt ( $n=5$  Northern blot). A legintenzívebb TASK-1 jelet tehát a kapszuláris (glomerulóza) szövetben kaptuk, azonban a mellékvesén belül a TASK-1 csatorna valamely egyéb szövetben is expresszálódik, mivel a

fascikuláta/retikuláris réteget és a mellékvese velőt magába foglaló dekapszulált mellékvese is jelentős TASK-1 mRNA kifejeződést mutatott. Míg a TASK-1 expresszió jól vizsgálhatónak bizonyult, TWIK-1, TREK-1 és TRAAK csatornákat nem tudtunk kimutatni glomerulóza szövetben Northern blottal. Ennek megfelelően e csatornák expressziós szintje igen alacsony lehet, csak a rendkívül érzékeny RT-PCR eljárással sikerült glomerulóza RNS-ből terméket sokszorosítanunk TWIK-1 illetve TREK-1 csatornákra specifikus oligonukleotid párokkal.



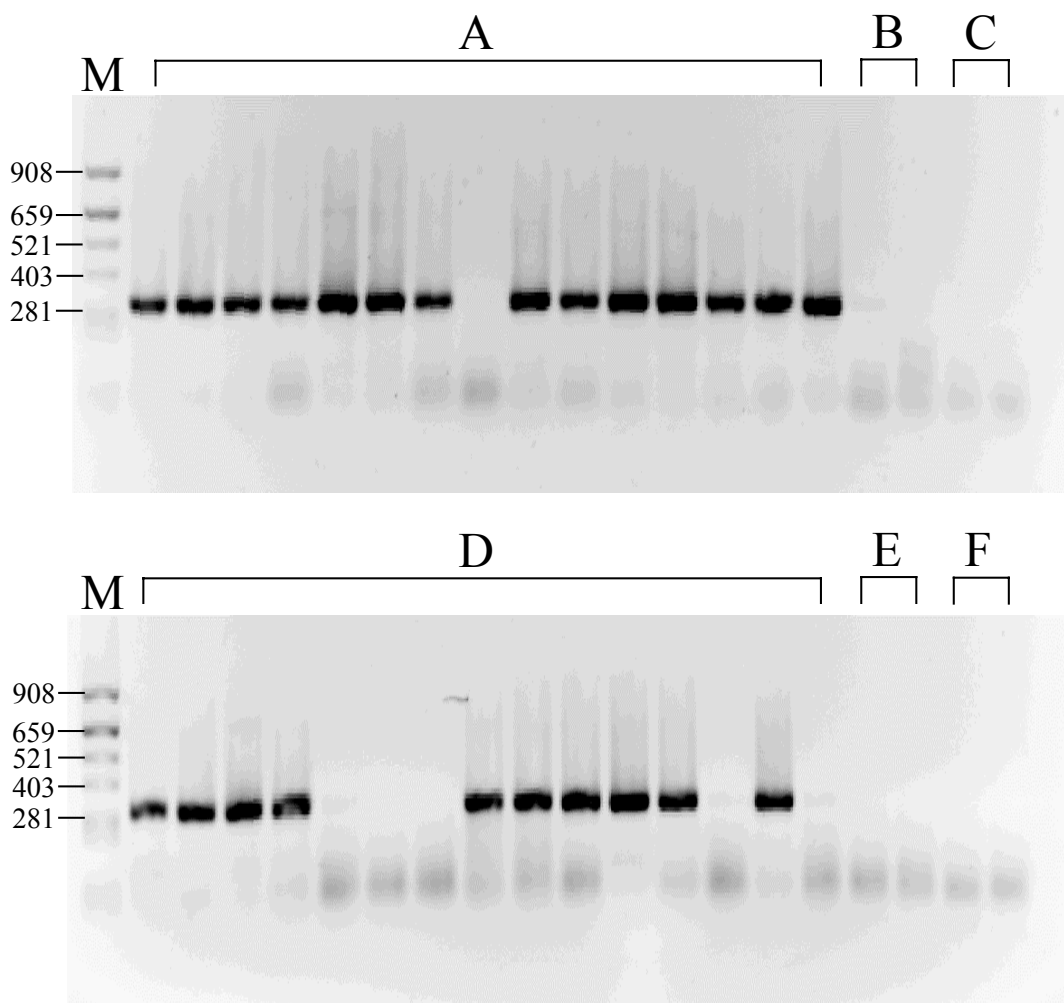
### 3. ábra A TASK-1 mRNA kifejeződése különböző patkány szövetekben

(A) Reprezentatív Northern blot (10-10  $\mu$ g RNS a különböző szövetekből) a TASK1s-TASK1a szondával. (B) GAPDH szondát használtunk ugyanazon a bloton kontrollnak. A háttér levonása után a TASK-1 csíkok beütésszámát elosztottuk a megfelelő GAPDH csík radioaktivitásával ( $\Rightarrow$  hányados). Az egyes szövetek hányadosát normalizáltuk a glomerulóza szövet hányadosára.

A dekapszulált mellékvese TASK-1 jeléért legalább részben felelős lehet a csatorna kifejeződése a szintén szteroid termelő fascikuláta és retikuláris sejtekben. Ennek vizsgálatára, illetve a TASK-1 expresszió sejtszintű kimutatására glomerulóza szövetben, egyedi sejtekből végeztünk RT-PCR kísérleteket (4. ábra). Ezzel az eljárással 29 glomerulóza sejtéből 28 mutatott TASK-1 expressziót, míg a vizsgált 29



fascikuláta/retikuláris sejt közül szignifikánsan kevesebb (21 sejt) bizonyult TASK-1 pozitívnak. A sokszorosított PCR termékek tényleges mRNS expressziót igazoltak, mivel a sejt kultúra sejtmentes médiumával végzett kontroll reakciók, illetve a genomiális DNS sokszorozódását kizáró reverz transzkripció nélkül végzett kísérletek nem adtak terméket.



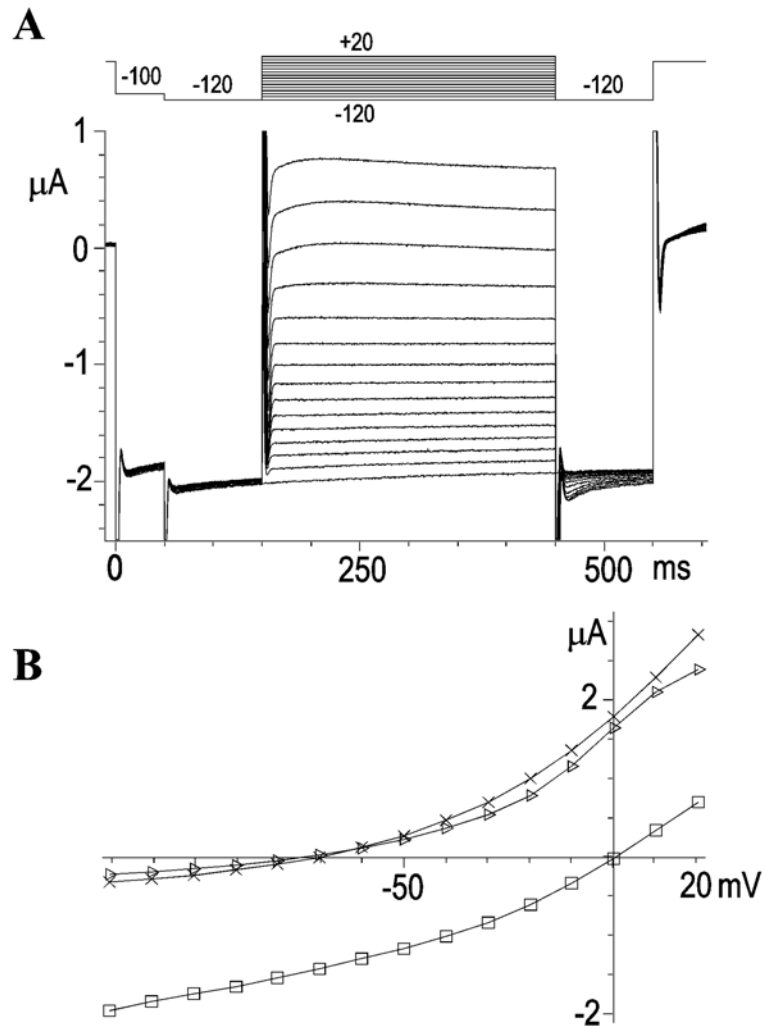
**4. ábra TASK-1 mRNS kimutatás egyedi glomerulóza és fascikuláta/retikuláris sejtekből**

TASK-1 nested RT-PCR reakciót végeztünk: egyedi glomerulóza sejtekből (A), a glomerulóza sejtek tenyésztőfolyadékából (B), egyedi glomerulóza sejtekből reverz transzkripció nélkül (C), egyedi fascikuláta/retikuláris sejtekből (D), egyedi fascikuláta/retikuláris sejtek tenyésztőfolyadékából (E) és egyedi fascikuláta/retikuláris sejtekből reverz transzkripció nélkül (F). A PCR termék jóslott mérete 302 bázispár. (Két független kísérlet közül az egyiket mutatom be.)

## 2. Az afrikai karmosbéka petesejtek alkalmasak a glomerulóza és a TASK-1 háttér $K^+$ áramok összehasonlítására

Magyarországon tudomásunk szerint elsőként alkalmaztuk az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) petesejt heterolog expressziós rendszert. Az általunk használt módszer több szempontból is előnyösnek bizonyult  $K^+$  áramaink tanulmányozásában. Lehetővé tette, hogy egy adott szövetre jellemző, még ismeretlen, esetleg több komponensből álló áramot (az adott esetben a glomerulóza szövetből tisztított mRNS injektálásával kifejezett áramot) azonos körülmények között hasonlíthassunk össze egy ‘tisztá’, egymagában, molekuláris biológiai módszerekkel kifejezett árammal (az adott esetben az in vitro szintetizált TASK-1 cRNS injektálásával létrehozott árammal).

A hatalmas, 1-1.2 mm átmérőjű béka petesejtek méretükhöz képest igen kis amplitúdójú endogén áramokkal rendelkeznek. Különösen érvényes ez abban az erősen negatív membránpotenciál-tartományban (-100, -120 mV), melyet mi a háttér  $K^+$  áramok mérésére választottunk. A kicsiny endogén áramon túlmenően célszerű volt ez a választás azért is, mert az erősen hiperpolarizált feszültségen a befelé irányuló  $K^+$  áram nagyságát lényegében csak két tényező határozza meg, az extracelluláris (EC)  $K^+$  koncentráció (melyet szabadon beállíthatunk) és a membrán pillanatnyi  $K^+$  permeabilitása (melyre következtetni szeretnénk). Kontroll (nem, vagy desztillált vízzel injektált) petesejteknel az EC  $K^+$  koncentrációt 2-ről 80 mM-ra emelve a befelé irányuló áram -100 mV-on mért amplitúdójának növekedése (továbbiakban  $I_{D80-2}$ ) csak kis mértékű (50-100 nA) volt. (A tíz legnagyobb növekedést mutató kontroll oocyta átlaga  $111 \pm 8$  nA-nek adódott (a 35 mért közül)). Ennél az értéknél a glomerulóza mRNS-sel injektált oocyták típusosan egy nagyságrenddel nagyobb áram növekedést mutattak, a tíz legnagyobb expressziójú sejt átlaga  $1882 \pm 120$  nA volt (a 84 mért közül. Reprezentatív feszültség-áram összefüggésként ld. 5. ábra, B). A TASK-1 cRNS-sel injektált oocytákban az elérhető  $I_{D80-2}$  értékek még nagyobbak, több  $\mu A$ -esnek bizonyultak. Mivel a Goldman-Hodgkin-Katz áram egyenlet szerint az általunk mért  $I_{D80-2}$  érték (néhány százalék eltéréstől eltekintve) egyenesen arányos a petesejt membrán  $K^+$  permeabilitásával, legjobban expresszáló oocytáink  $K^+$  permeabilitásának csak kevesebb, mint 10 %-áért lehettek felelősek a petesejt endogén  $K^+$  csatornái.



**5. ábra Egy olyan Xenopus petesejt áramai, melyet mellékvese glomerulóza szövetből tisztított mRNS-sel injektáltunk**

(A) Magas 80 mM EC  $[K^+]$ -ban az áramokat 300 ms hosszú, -120 mV-tól +20 mV-ig terjedő, 10 mV-onként növekvő feszültséglépésekkel váltottuk ki. (B) Az  $I_{mRNS}$  steady-state feszültség-áram összefüggése (melyet a 300 ms hosszú feszültséglépések végén mértünk) 2 mM ( $\blacktriangleright$ ) és 80 mM ( $\square$ ) EC  $[K^+]$ -ban, majd ismét 2 mM ( $\times$ ) EC  $[K^+]$ -ban a magas  $K^+$  koncentráció kimosása után. (Az ábra egy reprezentatív sejt áramait mutatja.)

A glomerulóza  $K^+$  áramok kifejeződése megmutatkozott a petesejtek nyugalmi membránpotenciáljának alakulásában is. A glomerulóza mRNS expresszió hatására az oocyták nyugalmi potenciálja negatívabbá vált a kontrollokénál ( $-80.9 \pm 1.6$  mV volt a tíz legnegatívabb membránpotenciál átlaga mRNS injektált petesejtekben, míg  $-44.3 \pm 1.7$  mV a tíz legnegatívabb membránpotenciál értékkel bíró kontroll oocytában). Azokban a glomerulóza áramot kifejező petesejtekben, melyekben igen negatív ( $< -87$  mV) nyugalmi potenciált mértünk a szokásos 2 mM EC  $[K^+]$ -ban, az EC  $[K^+]$ -t 80 mM-ra

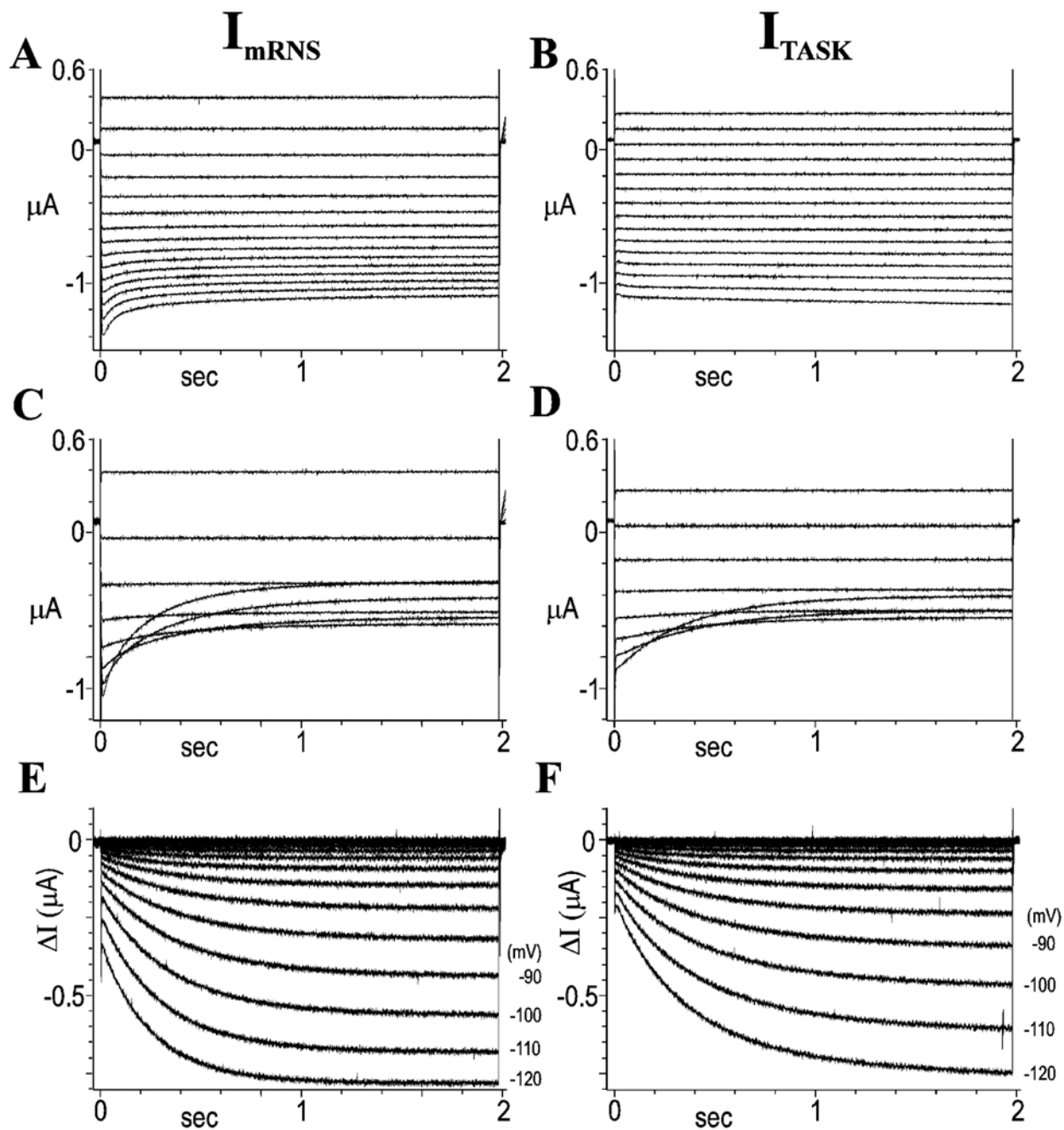
emelve a membránpotenciál átlagosan  $90 \pm 1.8$  mV-tal tolódott el ( $n=4$ ), mely érték jól közelíti a Nernst egyenletből számított  $93$  mV  $K^+$  egyensúlyi potenciál eltolódást.

### **3. A glomerulóza és TASK-1 háttér $K^+$ áramok farmakológiai tulajdonságai hasonlóak**

A gátlószerek hatását a glomerulóza vagy TASK-1 háttér  $K^+$  áramot ( $I_{mRNS}$ , illetve  $I_{TASK-1}$ , megfelelően) kifejező oocytákon  $80$  mM EC  $K^+$  koncentrációban  $-100$  mV-on mértük. A gátlószer jelenlétében és hiányában mért áramokból levontuk a  $2$  mM EC [ $K^+$ ]-ban mért nem specifikus áramot, majd a gátlást fejeztük ki %-ban. A klasszikus  $K^+$  csatorna gátlószer tetraetil-ammónium ( $3$  mM) nem gátolta sem a glomerulóza háttér  $K^+$  áramot ( $8 \pm 3$  % gátlás,  $n=5$ ), sem a TASK-1 áramot ( $6 \pm 2$  %,  $n=5$ ) számottevően. Hasonlóan, a feszültségfüggő  $K^+$  csatorna gátlószer, 4-aminopiridin ( $3$  mM) sem befolyásolta lényegesen egyik áramot sem ( $I_{mRNS}$ :  $2 \pm 1$  %,  $n=5$ ;  $I_{TASK-1}$ :  $6 \pm 5$  %,  $n=6$ ). A TASK-1 nem specifikus, gyenge gátlószereként leírt lidokain ( $1$  mM, (34)) a mi kísérleti körülményeink között is gátolta a TASK-1-t ( $38 \pm 6$  %,  $n=5$ ), és bár egy kicsit gyengébben, de az  $I_{mRNS}$ -t is ( $28 \pm 2$  %,  $n=10$ ).

A fenti gátlószereknél specifikusabb megközelítést eredményezett a  $Ba^{2+}$  és  $Cs^+$  ionok gátlási tulajdonságainak elemzése. A bárium  $100$   $\mu$ M-os, a befelé rektifikáló  $K^+$  csatornák legtöbb típusát erőteljesen gátló koncentrációja az  $I_{mRNS}$ -t csak mérsékelten ( $23 \pm 2$  %,  $n=5$ ) gátolta. Még magasabb koncentráció,  $300$   $\mu$ M, már kifejezett gátlást okozott ( $41 \pm 3$  %,  $n=6$ ), melynek mértéke megegyezett a TASK-1 gátlási értékével ( $39 \pm 2$  %,  $n=6$ ). Ezen az egyezésen kívül feltűnt, hogy a gátlás feszültségfüggést mutat, a  $300$   $\mu$ M-os koncentráció, mely  $-100$  mV-on még  $40$  %-ban gátolt,  $-40$  mV-nál depolarizáltabb feszültségeken semmilyen látható hatással nem rendelkezett. Ráadásul a gátlás teljes kialakulásához mind az  $I_{mRNS}$ , mind az  $I_{TASK-1}$  esetében elég hosszú időre volt szükség a  $0$  mV-os tartó potenciálról az erősen negatív teszt-potenciálra lépést követően.

Ezért egyenlő amplitúdójú  $I_{mRNS}$ -t és  $I_{TASK-1}$ -t expresszálo petesejtek  $Ba^{2+}$  érzékenységét hasonlítottuk össze hosszú ( $2$  sec),  $0$  mV tartó potenciálról indított

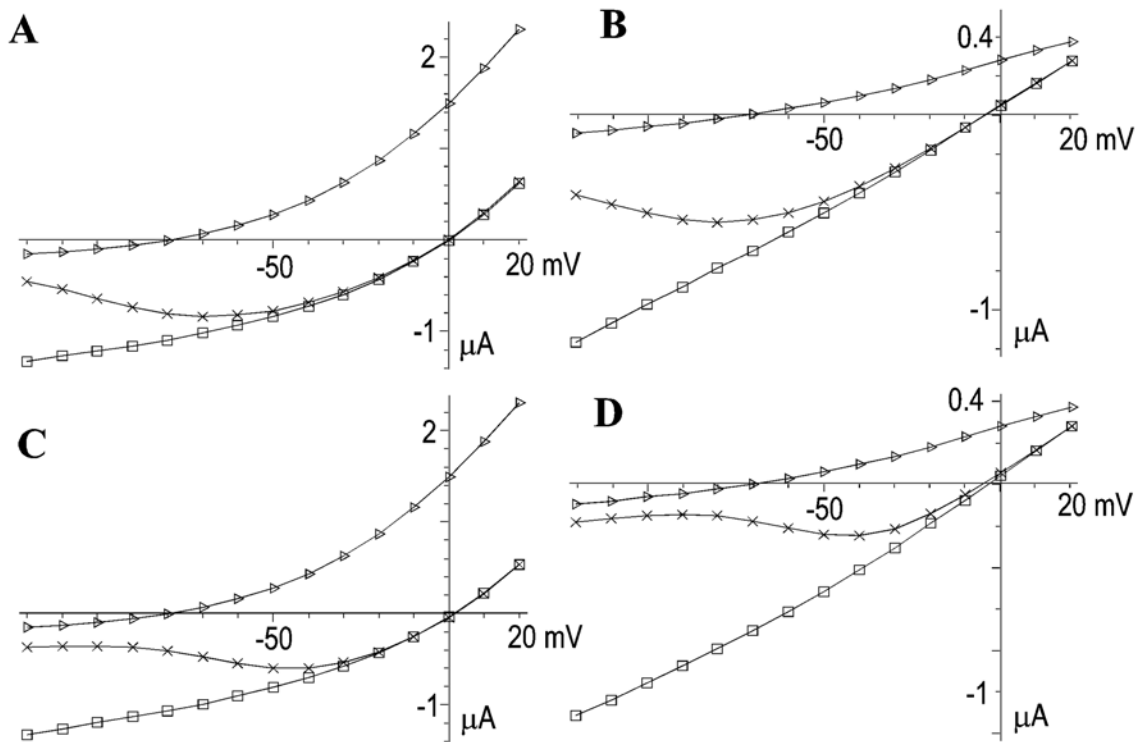


### 6. ábra A $\text{Ba}^{2+}$ által létrehozott gátlás időfüggése

Az  $I_{mRNS}$  (A,C) és  $I_{TASK-1}$  (B,D) áramok 80 mM EC  $[\text{K}^+]$ -ban,  $\text{Ba}^{2+}$  nélkül (A,B), illetve 300  $\mu\text{M}$   $\text{Ba}^{2+}$  jelenlétében (C,D). A petesejtek membránpotenciálját 0 mV-on tartottuk és az áramokat 2 másodperc hosszú -120 mV-tól +20 mV-ig terjedő, 10 mV-onként növekvő feszültséglépésekkel váltottuk ki. (A C és D paneleken csak minden második görbe látható.) A kontroll görbékből ( $\text{Ba}^{2+}$  nélkül, A és B) rendre kivontuk a  $\text{Ba}^{2+}$  jelenlétében mérteteket (C és D) és a gátló áramokat az E ( $I_{mRNS}$ ) és F ( $I_{TASK-1}$ ) paneleken ábrázoltuk. (Az ábra két reprezentatív sejt áramait mutatja)

feszültséglépésekkel (-120 mV-tól +20 mV-ig terjedő tartományban). A gátlás kifejlődésének időfüggése az  $I_{mRNS}$  és TASK-1 áram esetében jó egyezést mutatott (6. ábra). Megegyezett továbbá a steady-state gátlás feszültségfüggése is, melyet a fenti feszültséglépések végéből készített feszültség-áram összefüggés szemléltet jól (7. ábra, A és B). Feszültségfüggő  $Ba^{2+}$  gátlási eredményeinkre a nyílt csatorna pórus Ann Woodhull féle modelljét (74) alkalmazva  $16.8 \pm 2.2$  mM disszociációs konstans és  $0.98 \pm 0.03$  zδ érték adódott eredményül (ahol  $z=2$  a töltésszám), mely szerint a  $Ba^{2+}$  ion a transzmembrán elektromos tér kb. felén hatol át ( $\delta \approx 0.5$ ), mielőtt gyenge kötőhelyét elérné a csatorna pórusában.

A  $K^+$  ionhoz hasonló, de nagyobb átmérőjű  $Cs^+$  szintén feszültségfüggő módon gátolta a TASK-1-t és az  $I_{mRNS}$ -t. A  $Cs^+$  (3 mM) által kifejtett gátlás mértéke ( $I_{mRNS}$   $71 \pm 3$  %,  $n=5$ ;  $I_{TASK-1}$   $82 \pm 4$  %,  $n=6$ ) és feszültségfüggése is hasonló volt a két áramnál (7. ábra, C és D). A gátlás pozitívabb feszültség-tartományban fejlődött ki, mint a  $Ba^{2+}$



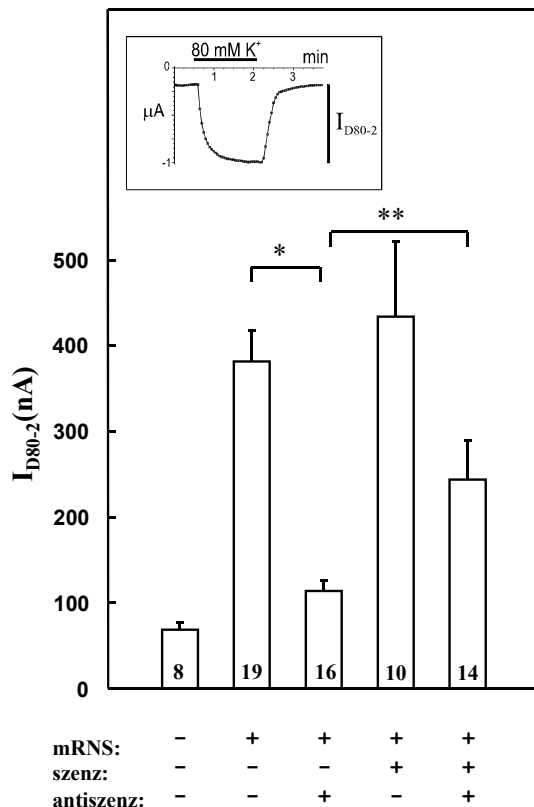
### 7. ábra A $Ba^{2+}$ és $Cs^+$ által kifejtett gátlás feszültségfüggése

Alacsony (2 mM,  $\blacktriangleright$ ) és magas (80 mM) EC  $[K^+]$ -ban a gátló ion jelenlétében ( $\times$ ) és hiányában ( $\square$ ) ábrázoltuk a steady-state feszültség-áram összefüggést a 2 másodperc hosszú feszültséglépések végén. ( $I_{mRNS}$ , 300  $\mu M$   $Ba^{2+}$  (A);  $I_{TASK-1}$ , 300  $\mu M$   $Ba^{2+}$  (B);  $I_{mRNS}$ , 3 mM  $Cs^+$  (C);  $I_{TASK-1}$ , 3 mM  $Cs^+$  (D)). (Az ábra egyedi sejtek áramait mutatja)

esetében, és a feszültségfüggése is jóval meredekebb volt annál. A gátlás kb. -110 mV-nál elérte maximumát, azonban itt sem volt teljes. A Cs<sup>+</sup> pillanatszerűen, a mérőműszerünk feszültségbeállítási sebességével összemérhető gyorsasággal hozta létre I<sub>mRNS</sub> és TASK-1 gátló hatását.

#### 4. A TASK antiszenz oligonukleotid meggátolja az I<sub>mRNS</sub> kifejeződést, azonban a glomerulóza háttér K<sup>+</sup> áram a TASK-1 csatornánál kevésbé pH érzékeny

Antiszenz eljárást alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy a TASK-1 milyen mértékben járul hozzá a glomerulóza háttér K<sup>+</sup> áram kialakításához. A TASK5'a antiszenz oligonukleotid a TASK-1 mRNS start kodonjához, illetve az azt megelőző 4 és azt követő 15 bázisához hibridizált. A kontrollként használt, 25 nukleotid hosszú TASK5's primer 18 bázis hosszan volt komplementer az antiszenz oligonukleotiddal. Az oligonukleotidokat a nem specifikus RNS lebomlás elkerülése érdekében 2-3 órával a glomerulóza mRNS injektálását követően juttattuk a sejtbe. Az antiszenz oligonukleotid az I<sub>mRNS</sub> expressziót 85 %-ban gátolta, az antiszenz injektált petesejtek K<sup>+</sup> permeabilitása csaknem megegyezett a desztillált vízzel injektált petékével (8. ábra).



#### 8. ábra A szenz és antiszenz TASK oligonukleotidok hatása az I<sub>mRNS</sub> kifejeződésre

Minden harmadik másodpercben a -30 mV-os tartópotenciálról egy 300 ms hosszú feszültséglépést alkalmaztunk -100 mV-ra, melynek végén mértük az áramot. Az I<sub>D80-2</sub> értéket úgy számoltuk, hogy a 80 mM EC [K<sup>+</sup>]-ban mért legnagyobb áramból levontuk a 2 mM EC [K<sup>+</sup>]-ban a 80 mM-os koncentrációt megelőzően és követően mért áramok átlagát (ld. bal felső kis panel). Az oszlopokban lévő számok a két békából származó petesejtek darabszámát jelentik. (A statisztikai különbségeket Mann-Whitney U teszttel vizsgáltuk \*p<10<sup>-5</sup>; \*\*p<0.0015)

A kontroll szenz oligonukleotidnak nem volt gátló hatása, sőt ha a szenz oligonukleotidot az antiszenzzel együtt injektáltuk, akkor a szenz képes volt (mintegy felerészben) megakadályozni az antiszenz gátló hatását, ezzel igazolva az antiszenz egyszálú DNS specificitását az  $I_{mRNS}$  kifejeződés kivédésében (8. ábra).

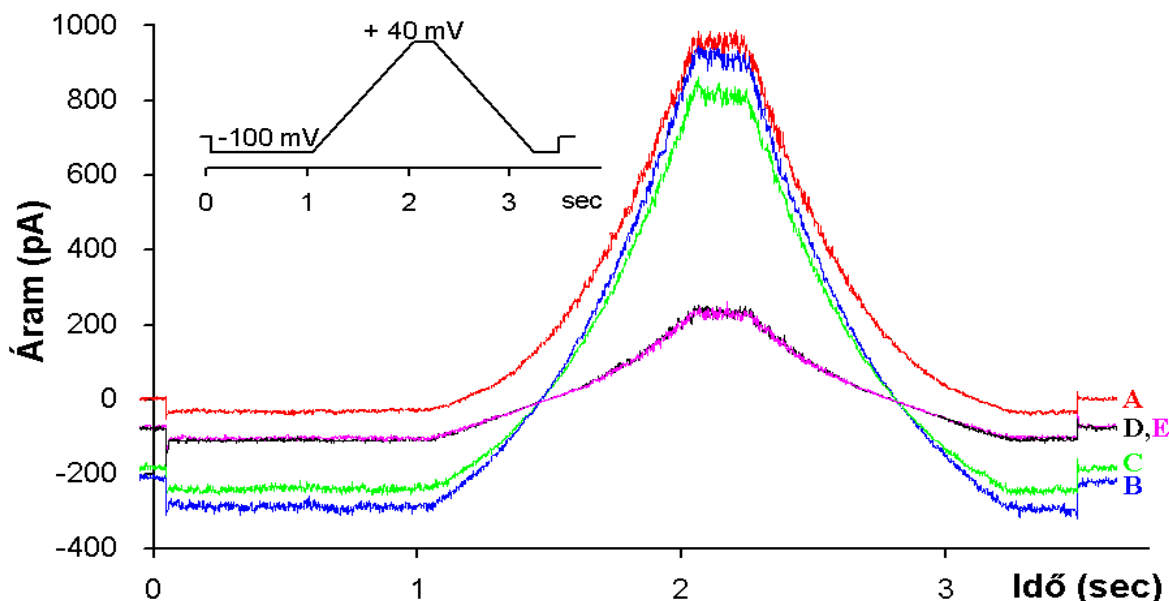
A TASK-1 rendkívüli pH érzékenységet mutat a fiziológias pH tartományban. Az extracelluláris pH-t 7.5-ről 6.7-re csökkentve, az oocytákban kifejezett  $I_{TASK-1}$   $60 \pm 3$  %-kal gátlódott ( $n=3$ ), mely megfelel az irodalomban leírt érzékenységnek (16;34). Logikusnak tűnt tehát megvizsgálni a glomerulóza háttér  $K^+$  áram pH érzékenységét ugyanebben a tartományban. Meglepetésünkre a petesejtekben kifejezett  $I_{mRNS}$  és a glomerulóza sejten patch clappal mért háttér  $K^+$  áram egyaránt kevésbé volt érzékeny savanyításra. Az  $I_{mRNS}$   $16 \pm 2$  % gátlást mutatott a 7.5-6.7 pH lépésre ( $n=14$ ), a glomerulóza sejt háttér  $K^+$  árama -100 mV-on, 30 mM  $[K^+]$ -ban  $17 \pm 2$  %-kal gátlódott a pH 7.4-ről 6.7-re változtatása során ( $n=10$ , ld. a B és A, illetve C és A görbék különbségét a biramp-et megelőző feszültséglépés során a 9. reprezentatív ábrán). Ha a glomerulóza háttér  $K^+$  áram és a TASK-1 pH érzékenységét vesszük alapul, akkor ezen eredmények azt mutatják, hogy a TASK-1 legfeljebb a glomerulóza áram mintegy 25-30 %-áért lehet felelős.

## **5. Az angiotenzin II gátolja a glomerulóza háttér $K^+$ áramot és a TASK-1 csatornát**

A glomerulóza sejt egyik fő fiziológias ingere, az angiotenzin II, gátolja a sejt háttér  $K^+$  áramát. A maximális hatást kiváltó angiotenzin II (10 nM)  $61 \pm 7$  %-kal ( $n=6$ ) gátolta a patch clappal glomerulóza sejten, 30 mM extracelluláris  $K^+$  koncentrációban, pH 7.4-en, -100 mV-on mért áramot (ld. a B és A, illetve D és A görbék különbségét a 9. reprezentatív ábrán). Az extracelluláris tér pH 6.7-re savanyítása nem okozott további gátlást angiotenzin II-vel történő ingerlést követően (9. ábra, D és E görbék), vagyis az angiotenzin II a pH érzékeny komponenst teljes egészében gátolta. Az angiotenzin II a negatív feszültség-tartományban döntően az általunk vizsgálni kívánt háttér  $K^+$  áramot befolyásolta, mivel az 1 másodpercig -100 mV-on mért áram főként 30 mM EC  $[K^+]$ -ban jelentkezett ( $307 \pm 80$  pA,  $n=10$ ), szemben a 3.6 mM-ban mért  $56 \pm 20$  pA-rel. Az



angiotenzin II és a savanyítás egyaránt  $K^+$  áramot gátolt, mivel a hatásukra megváltozott áram görbéi a kontroll görbét egyazon pontban metszték a biramp során. A kereszteződés  $-38 \pm 2$  mV-nál következett be mindkét esetben, mely pontosan megfelel a számított  $K^+$  egyensúlyi potenciálnak ( $-39$  mV)  $30$  mM EC  $[K^+]$ -ban (9. ábra, B és C, illetve B és D görbék metszéspontjai).



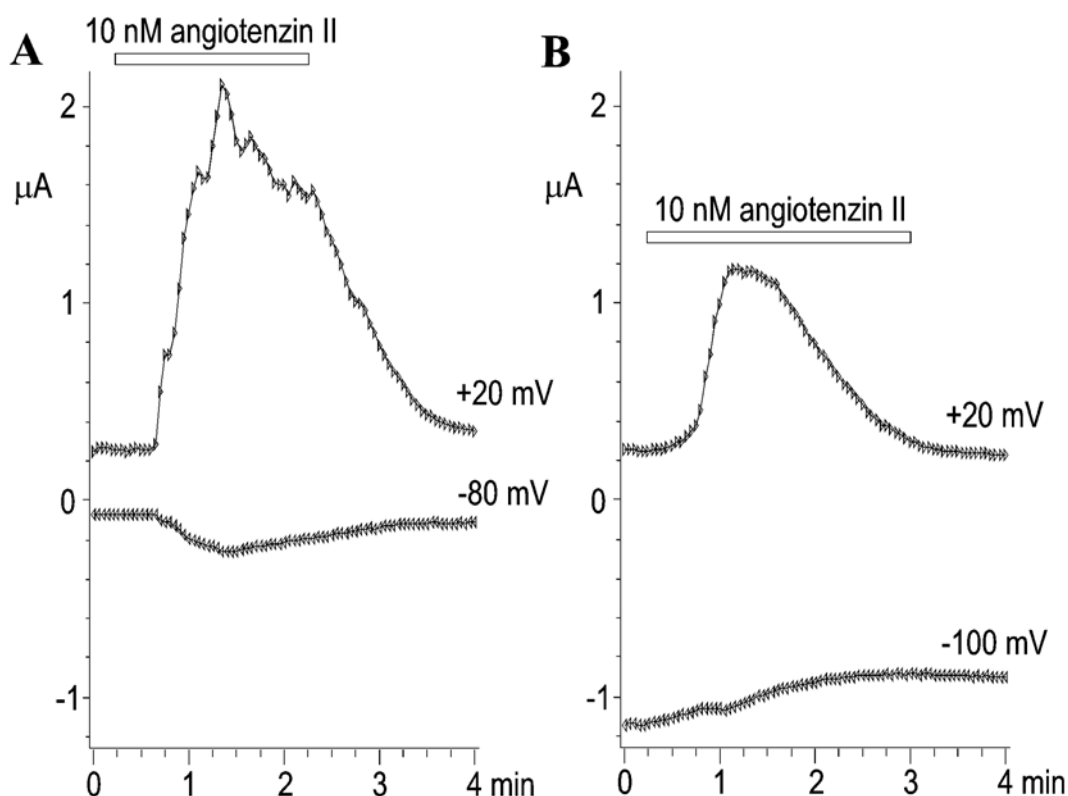
**9. ábra A glomerulóza sejt háttér  $K^+$  áramának gátlása savanyítás és/vagy angiotenzin II hatására**

(A)  $3.6$  mM extracelluláris (EC)  $[K^+]$ , pH  $7.4$ ; (B)  $30$  mM EC  $[K^+]$ , pH  $7.4$ ; (C)  $30$  mM EC  $[K^+]$ , pH  $6.7$ ; (D)  $30$  mM EC  $[K^+]$ , pH  $7.4$ ,  $10$  nM angiotenzin II; (E)  $30$  mM EC  $[K^+]$ , pH  $6.7$ ,  $10$  nM angiotenzin II. (Biramp depolarizáció  $-100$  mV-ről  $+40$  mV-ra (ld. a feszültség-protokolt). A tartópotenciál  $-80$  mV volt.)

Megvizsgáltuk, vajon a háttér  $K^+$  áram gátolható-e angiotenzinnel heterolog expressziós rendszerünkben is. A glomerulóza szövetből tisztított mRNS-sel injektált *Xenopus* petesejtek reagáltak angiotenzin II ingerlésre. (A glomerulóza mRNS az ioncsatorna mRNS-eken kívül nyilván angiotenzin II receptor mRNS-t is tartalmazott). Az angiotenzin II válaszkészséget könnyen megítélhetővé tették a petesejtek endogén  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  csatornái, melyek az angiotenzin II receptor aktiválódás hatására megjelenő  $Ca^{2+}$  jelet  $Cl^-$  áram formájában tükrözték. A jelentős háttér  $K^+$  áramot is kifejező oocytákban a  $K^+$  áram és a  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áram egymással párhuzamosan, jól

elkülöníthetően volt mérhető egy olyan feszültséglépés-sorozattal, mellyel váltakozva regisztráltuk az áramot -100 illetve +20 mV-on.

Angiotenzin II ingerlésre a glomerulóza mRNS-t kifejező petesejt feszültségfüggő (depolarizáció-aktivált)  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  csatornái kifejezett kifelé irányuló áramot hoztak létre +20 mV-on, azonban erősen negatív potenciálokon csak egy kicsiny befelé irányuló áramot eredményeztek (mely a  $\text{K}^+$  áramtól elkülönítve alacsony (2 mM) EC  $[\text{K}^+]$ -ban volt jól látható, ld. 10. ábra, A). Magas (80 mM) EC



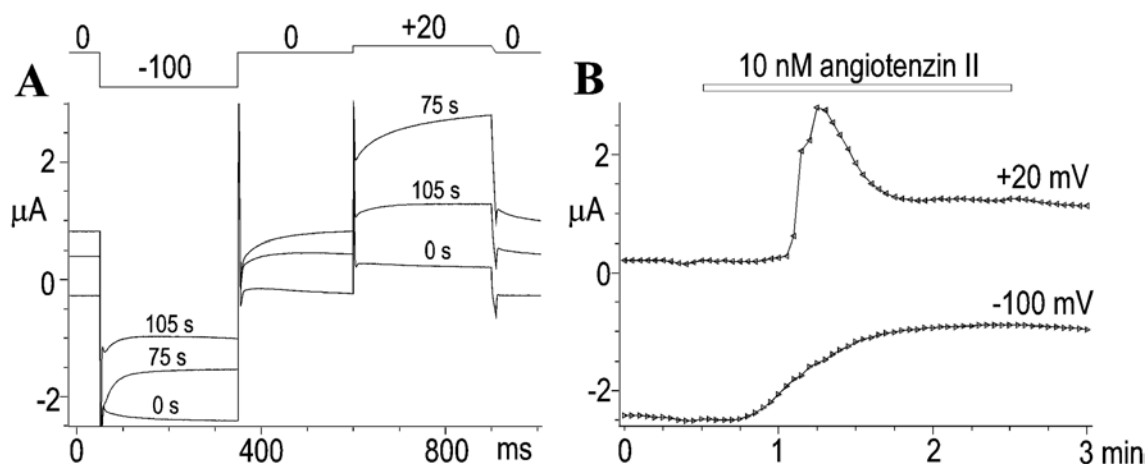
**10. ábra Az angiotenzin II (10 nM) hatása erősen negatív feszültségen és +20 mV-on, a 2 illetve 80 mM EC  $[\text{K}^+]$ -ban mért áramokra glomerulóza mRNS-sel injektált petesejtekben**

(A) Az EC  $[\text{K}^+]$  2 mM volt. Minden harmadik másodpercben egy 300 ms hosszú depolarizáló feszültséglépést alkalmaztunk +20 mV-ra a -80 mV-os tartópotenciálról. A -80 mV-on a feszültséglépést megelőző és a feszültséglépés végén (+20 mV-on) mért áramokat ábrázoltuk az idő függvényében. (B) Az EC  $[\text{K}^+]$  80 mM volt. Minden harmadik másodpercben egy -100 mV (300 ms), 0 mV (250 ms), +20 mV (300 ms) lépésekből álló lépéssorozatot (a 11. ábrán látható lerajzolva) alkalmaztunk 0 mV tartópotenciálról. A -100 mV-os és +20 mV-os lépések végén mért áramokat ábrázoltuk az idő függvényében.

[K<sup>+</sup>]-ban a kálium permeabilitás változása csak kevésbé befolyásolhatja a +20 mV-on mért áramot, mivel a +20 mV közel esik a K<sup>+</sup> egyensúlyi potenciáljához; -100 mV-on viszont döntően a befelé irányuló K<sup>+</sup> áramot tudjuk mérni, hiszen a fentiek szerint itt a Cl<sup>-</sup> áram csak kevésbé nyilvánul meg. Összegezve tehát, 80 mM EC [K<sup>+</sup>]-ban a -100 mV-on mért befelé irányuló áram döntően K<sup>+</sup> áram, míg +20 mV-on a kifelé folyó Ca<sup>2+</sup>-aktivált Cl<sup>-</sup> áram a meghatározó.

A legnagyobb mRNS expressziót mutató petesejtekben az angiotenzin II (10 nM) ingerlés a Ca<sup>2+</sup>-aktivált Cl<sup>-</sup> áramon kívül háttér K<sup>+</sup> áram gátlást is létrehozott (10. ábra, B), a befelé irányuló áram -100 mV-on (80 mM [K<sup>+</sup>]-ban) csökkent. Annak ellenére, hogy oocytákban a gátlás mértéke kisebb volt, mint a glomerulóza sejten patch clampel mérve (sőt az alacsonyabb expressziójú sejteken nem is lehetett megfigyelni), eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a K<sup>+</sup> áram gátlásért felelős mechanizmus működik az oocytákban is. Ezért megvizsgáltuk, hatással van-e az angiotenzin II receptor ingerlés a TASK-1 csatorna aktivitásra oocytában.

Az AT<sub>1a</sub> angiotenzin II receptor és TASK-1 cRNS-sel koinjektált petesejtekben az angiotenzin II ingerlés (10 nM) Ca<sup>2+</sup>-aktivált Cl<sup>-</sup> áramot hozott létre, ezzel igazolva a receptor expressziót. Érdekes módon a legtöbb esetben már a Cl<sup>-</sup> áram megjelenése előtt



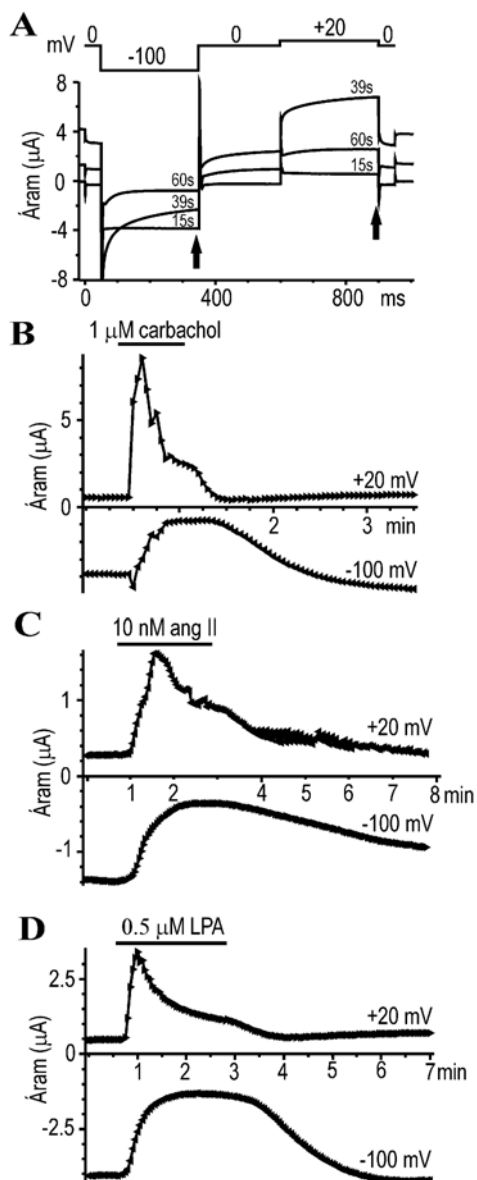
**11. ábra TASK-1 gátlás angiotenzin II-vel (10 nM) egy TASK-1 és angiotenzin II receptor cRNS-sel koinjektált petesejtben**

(A) Minden harmadik másodpercben az ábrán látható feszültséglépés sorozatot alkalmaztuk 0 mV tartópotenciálról. Az angiotenzin II ingerlés előtti (0 s), a Ca<sup>2+</sup>-aktivált Cl<sup>-</sup> áram tetőpontján mért (75 s) és a maximális TASK-1 gátlás kialakulása utáni (105 s) áramokat ábrázoltuk. (B) A -100 és +20 mV-os lépések végén mérhető áramot ábrázoltuk az idő függvényében.

megfigyelhető volt a TASK-1 gátlás kialakulásának kezdete, mely gátlás csak később vált teljessé ( $77 \pm 1\%$ ,  $n=16$ ), és a kezdeti  $\text{Ca}^{2+}$  (illetve az annak megfelelő  $\text{Cl}^-$  áram) csúcs lezajlása után is fenntartott maradt (11. ábra). A gátlás az angiotenzin II kimosása után hosszú idővel reverzibilisnek bizonyult (12. ábra, C).

## 6. Az $M_1$ muszkarinos acetilkolin, a lizofoszfátid sav és kisebb mértékben az EGF receptor is képes TASK-1 gátlást létrehozni

Az  $\text{AT}_{1a}$  angiotenzin II receptor TASK-1 gátló hatása nem e receptor valamely egyedi tulajdonságán alapul, mivel *Xenopus* petesejtekben egyéb  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló hormonreceptorokon keresztül is el lehetett érni a TASK-1 áram csökkenését (12. ábra).

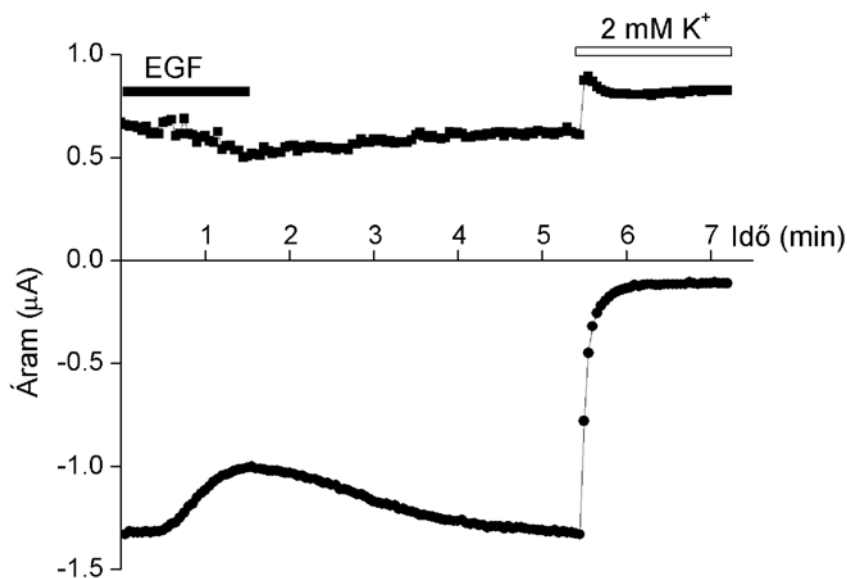


**12. ábra** A  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló hormonok gátolják a *Xenopus* petesejtekben kifejezett TASK-1 áramot

(A) Az  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort és TASK-1 csatornát kifejező petesejt áramait a 11. ábrán bemutatotthoz hasonlóan mértük magas 80 mM EC  $[\text{K}^+]$ -ban. A carbachol ( $1 \mu\text{M}$ ) ingerlés előtti (15 s), a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram tetőpontján mért (39 s) és a maximális TASK-1 gátlás kialakulása utáni (60 s) áramokat ábrázoltuk. (B) Ugyanannak az oocytának a  $-100$  és  $+20$  mV-os lépések végén mért áramait (ahogy azt az A panelen nyilak jelölik) ábrázoltuk az idő függvényében. (C) Egy  $\text{AT}_{1a}$  angiotenzin II receptort és TASK-1 csatornát koexpresszáló petesejt áramai angiotenzin II (ang II,  $10 \text{ nM}$ ) ingerlés során. Az agonista megvonása után a TASK-1 gátlás lassan reverzibilis, a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram pedig oszcillál. (D) Egy csak TASK-1-et expresszáló oocyta endogén lizofoszfátid sav receptorának ingerlése. (A feszültség protokoll a B- és D paneleken a B-vel megegyező volt.)

Az oocyta rendelkezik endogén lizofoszfátid sav (LPA) receptorral, LPA adása (0.5  $\mu\text{M}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  jelet hozott létre és  $67\pm 4\%$ -kal gátolta a TASK-1 áramot ( $n=10$ ).  $\text{M}_1$  muszkarinos acetilkolin receptor és TASK-1 cRNS-sel koinjektált oocytákban hasonló  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet és TASK-1 gátlást ( $77\pm 3\%$ ,  $n=9$ ) okozott a carbachol (1  $\mu\text{M}$ ).

Az irodalmi adatoknak megfelelően (42) egyes békákból ('variáns donor') származó petesejtek, a magas endogén acetilkolin receptor szintjük miatt, receptor koexpresszió nélkül is  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  árammal és TASK-1 gátlással válaszoltak a carbachol ingerlésre. A petesejt preparátumaink többségében ez a kifejezett válasz azonban nem jelent meg  $\text{M}_1$  receptor koexpresszió nélkül. Ha ilyen (nem 'variáns donorból' származó) petesejtekben a  $\text{G}_i$  fehérjét aktiváló  $\text{M}_2$  muszkarinos acetilkolin receptort koexpresszáltuk a TASK-1-gyel, akkor a carbachol ingerlés csak mérsékelt  $\text{K}^+$  áram gátlást okozott ( $24\pm 3\%$ ,  $n=10$ ), melyet típusosan  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram nem kísért. (Esetenként kis amplitúdójú (20-200 nA) oszcillációk voltak megfigyelhetők). A G fehérjéhez kapcsolt receptorokon kívül próbáltuk a TASK-1 áramot befolyásolni növekedési faktor receptoron keresztül is. Ha a TASK-1-et epidermális növekedési faktor (EGF) receptorral koexpresszáltuk, akkor az EGF ingerlés (5 nM) is gátolta a TASK-1 csatornát (13. ábra).



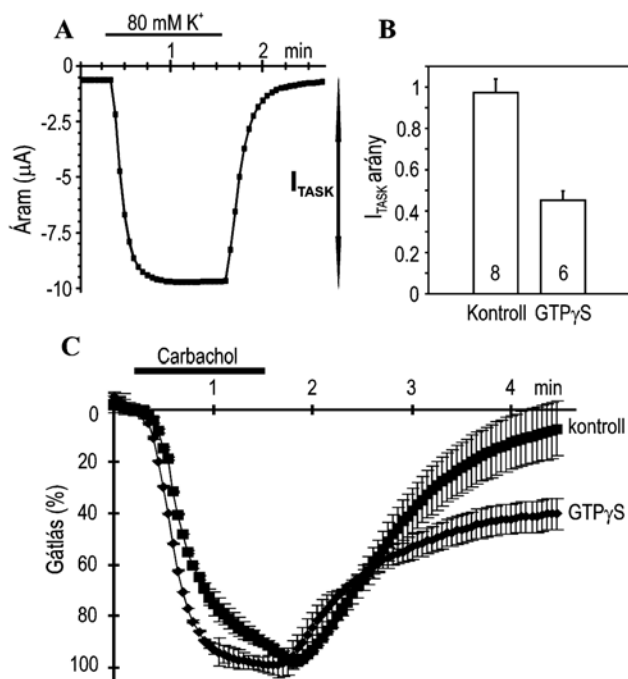
**13. ábra TASK-1 gátlás epidermális növekedési faktorról (EGF, 5 nM) egy EGF-receptort és TASK-1 csatornát koexpresszáló petesejtben**

Az EGF (fekete téglalap) megvonása után az extracelluláris  $[\text{K}^+]$ -t 80-ról 2 mM-ra változtattuk (fehér téglalap). Az áramokat a 11. ábrán bemutatottal megegyezően mértük.

## 7. A TASK-1 gátlásért a foszfolipáz C aktiváció felelős

### A TASK-1 gátlás kialakításában G fehérje szerepel

A TASK-1 csatornát kifejező petesejtek  $K^+$  áramát megmértük, majd a nem hidrolizáló GTP analóg guanozin-5'-O-(3-tiotrifoszfát)-ot ( $GTP\gamma S$ , 2 mM, 50 nl, mely az oocytában kb. tízszeresére hígul) vagy kontroll oldatot injektáltunk beléjük. (Mivel a  $GTP\gamma S$  tetralítium só volt, ezért a kontroll oldat 8 mM LiCl-ot tartalmazott.) Egy-három órával a  $GTP\gamma S$  injektálását követően újra megmértük a TASK-1 áramot. A  $GTP\gamma S$  gátolta a TASK-1 aktivitást ( $55\pm 4\%$ ,  $n=6$ ), míg a kontroll oldat nem befolyásolta azt (14. ábra, B). Ha TASK-1 és  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort koexpresszáló petesejteket injektáltunk  $GTP\gamma S$ -sel, majd 13-15 perccel később (eddigre  $23\pm 10\%$  gátlás fejlődött ki) carbachollal ingereltünk, akkor az inger megvonása után az áram visszaállása a  $GTP\gamma S$  kezelt csoportban nem volt teljes (14. ábra, C). (A kontroll oldattal injektált sejtekben a carbachol hatás reverzibilis volt.)

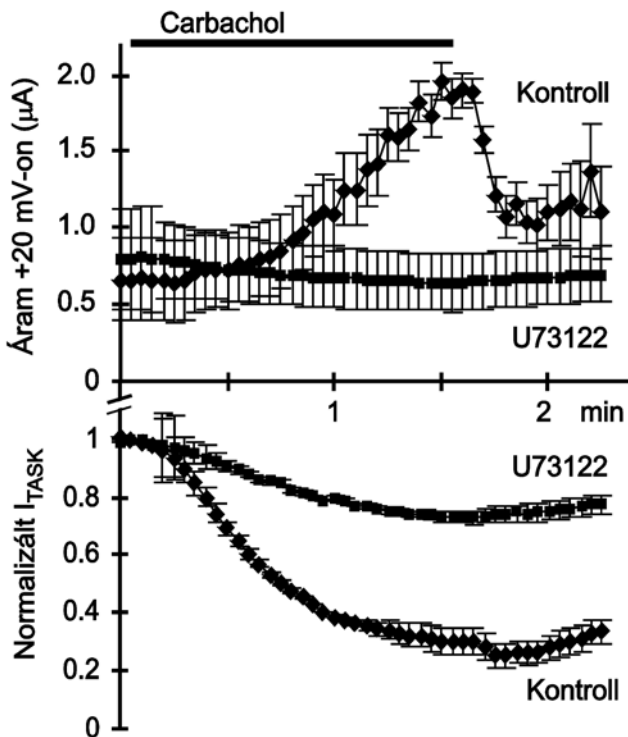


### 14. ábra A $GTP\gamma S$ injektálás gátolja a TASK-1 csatornát

(A) A TASK-1 áramot a 8. ábrán ismertetett módon mértük az EC oldat  $K^+$  koncentrációjának ideiglenes 2-ről 80 mM-ra emelésével. (B) A  $GTP\gamma S$  (2 mM, 50 nl), illetve kontroll oldat injektálás hatása a TASK-1 áramra *Xenopus* petesejtekben. Az injektálás után 1-3 órával mért áramot az ugyanazon oocytában az injektálás előtt mért áramra normalizáltuk ( $I_{TASK}$  arány). Az oszlopokban a mért petesejtek darabszáma látható. (C)  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort és TASK-1 csatornát kifejező petesejteket injektáltunk  $GTP\gamma S$  (2 mM, 50 nl,  $n=7$ ) vagy kontroll oldattal ( $n=8$ ). Az injektálás után 13-15 perccel 1  $\mu M$  carbachollal ingereltük a sejteket. (Az ábrázolt gátlást a carbachol ingerlés kezdetén mért értékhez viszonyítottuk.)

*A foszfolipáz C aktiváció a TASK-1 gátlás szükséges és elégséges feltétele*

A  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló hormonreceptorok TASK-1 gátló hatása és a G fehérje részvétele a gátlási folyamatban a foszfolipáz C lehetséges szerepére utalt. Ennek vizsgálatára TASK-1 és  $\text{M}_1$  receptort koexpresszáló oocytákat 45-75 percig előkezeltünk 2.5  $\mu\text{M}$  U73122 specifikus foszfolipáz C gátlószerrel. Ebben a koncentrációban a gátlószer nem volt hatással a TASK-1 áramra. Ha viszont a petesejteket carbachollal (0.3  $\mu\text{M}$ ) ingereltük (a gátlószer jelenlétében), akkor az U73122 a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram megjelenését és a TASK-1 gátlást egyaránt kivédte (15. ábra). A  $\text{Ca}^{2+}$ -jel eltűnése igazolta a gátlószer hatékonyságát a petesejtekben, míg a  $\text{K}^+$  áram gátlásának csökkentése azt mutatta, hogy a foszfolipáz C aktivációja szükséges az  $\text{M}_1$  receptor által kifejtett TASK-1 gátláshoz.

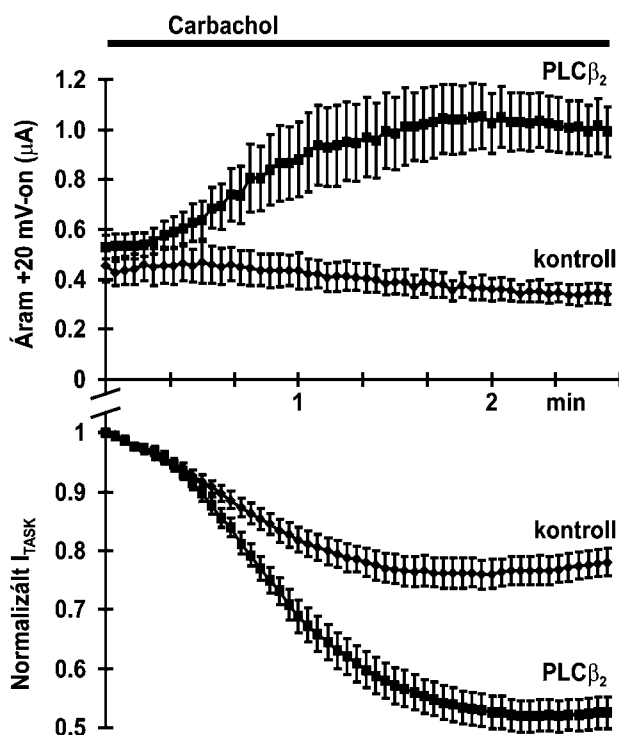


**15. ábra Az U73122 csökkenti a TASK-1 gátlást**

$\text{M}_1$  muszkarinos acetilkolin receptort és TASK-1 csatornát kifejező petesejteket előkezeltünk U73122-vel (2.5  $\mu\text{M}$ , n=5) vagy kontroll oldattal (DMSO megfelelően, n=6) 45-75 percig. Ezt követően carbachollal (300 nM) ingereltük őket és az áramaikat a 11. ábrán bemutatottnak megfelelően mértük -100 és +20 mV-on. A TASK-1 áramot az ingerlés kezdetén mért értékére normalizáltuk.

A foszfolipáz C  $\beta_2$  izoenzim koexpressziójával megvizsgáltuk, hogy a foszfolipáz C képes-e létrehozni a TASK-1 gátlást a  $\text{G}_q$  proteintől függetlenül is. A foszfolipáz C  $\beta_2$  izoenzim aktiválható a  $\text{G}_i$  fehérjék  $\beta\gamma$  alegységével (11), így a jelenlétében a  $\text{G}_i$  fehérje disszociációját okozó  $\text{M}_2$  receptor is foszfolipáz C aktivitást indukál. Az  $\text{M}_2$  receptort és TASK-1 csatornát koexpresszáló petékben a carbachollal (1

$\mu\text{M}$ ) való ingerlés csak enyhén ( $24 \pm 3\%$ ,  $n=10$ ) gátolta a TASK-1 áramot, és átlagában tekintve nem hozott létre  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot sem (16. ábra, kontroll görbék). Ha azonban az  $\text{M}_2$  receptor és TASK-1 mellett harmadik elemként foszfolipáz C  $\beta_2$ -t is koexpresszáltunk, akkor a carbachol egyrészt  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet hozott létre (ezzel a foszfolipáz expressziójának sikerét igazolva), másrészt erőteljesen gátolta a TASK-1 áramot ( $48 \pm 3\%$ ,  $n=10$ , 16. ábra, PLC $\beta_2$  görbék). Ezért az aktív foszfolipáz C a  $\text{G}_q$  jelátviteli úttól függetlenül is gátolja a TASK-1 csatornát.



**16. ábra A foszfolipáz C aktiváció gátolja a TASK-1 csatornát**

TASK-1 és  $\text{M}_2$  muszkarinos acetilkolin receptort kifejező petesejteket (kontroll,  $n=10$ ) vagy foszfolipáz C  $\beta_2$ , TASK-1 és  $\text{M}_2$  muszkarinos acetilkolin receptort kifejező petesejteket (PLC $\beta_2$ ,  $n=10$ ) ingereltünk carbachollal ( $1 \mu\text{M}$ ). A TASK-1 áramot az ingerlés kezdetén mért értékére normalizáltuk. (Az áramokat úgy mértük, mint a 11. ábrán)

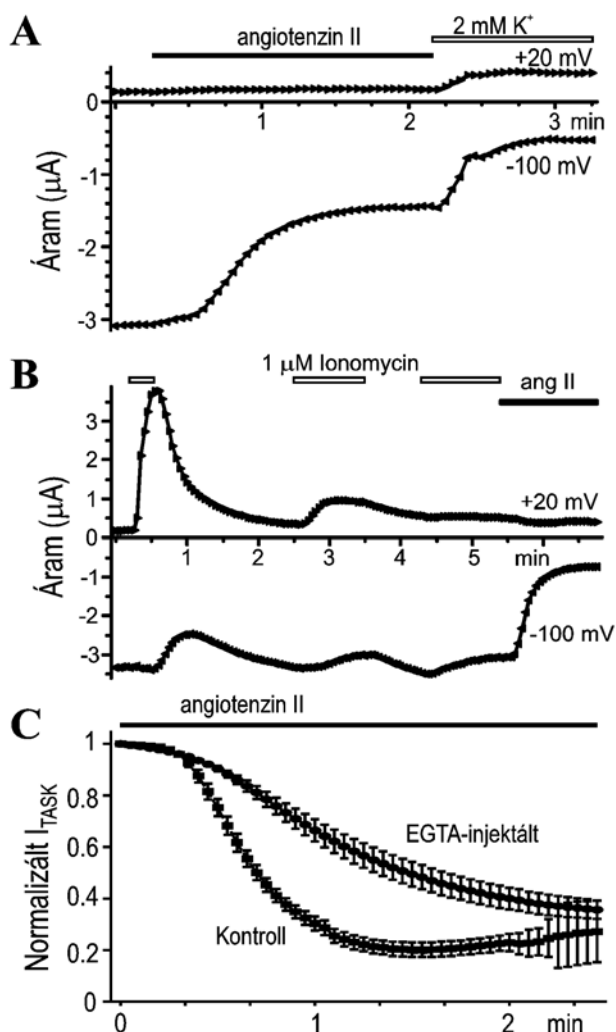
*A TASK-1 gátlást nem a citoplazma  $[\text{Ca}^{2+}]$  emelkedése, nem az inozitol-1,4,5-triszfoszfát ( $\text{IP}_3$ ), nem protein kináz C aktiválódás és nem tirozin kináz hozza létre*

Bár a TASK-1 gátlás kezdete sokszor megelőzte a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram megjelenését, elméletileg elképzelhető volt, hogy a citoplazma  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja szabályozza a TASK-1 csatornát. Ezt a lehetőséget a citoplazma nyugalmi és ingerlés alatti  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját növelő, illetve csökkentő beavatkozások segítségével vizsgáltuk. Ha a TASK-1 és angiotenzin II receptort koexpresszáló petesejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárait kiürítettük a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz gátlásával ( $1 \mu\text{M}$  thapsigargin előkezelés 5-6.5



óráig), akkor az ezt követő angiotenzin II (10 nM) ingerlés  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot már nem hozott létre, viszont a TASK-1 gátlás megtartott maradt ( $63 \pm 4\%$ ,  $n=7$ , 17. ábra, A). A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot magas koncentrációjú  $\text{Ca}^{2+}$ -kelátor injektálásával (100 mM EGTA, 50 nl) is ki lehetett védeni. Bár ez a kezelés némileg lelassította a TASK-1 gátlás kifejlődését, annak maximális mértékét nem változtatta meg (17. ábra, C).

Az  $\text{AT}_{1a}$  receptor-ingerlés tehát  $\text{Ca}^{2+}$ -jel hiányában is képes a TASK-1-et gátolni, de vajon a  $\text{Ca}^{2+}$  jel önmagában hatással van-e a TASK-1 aktivitásra? Az



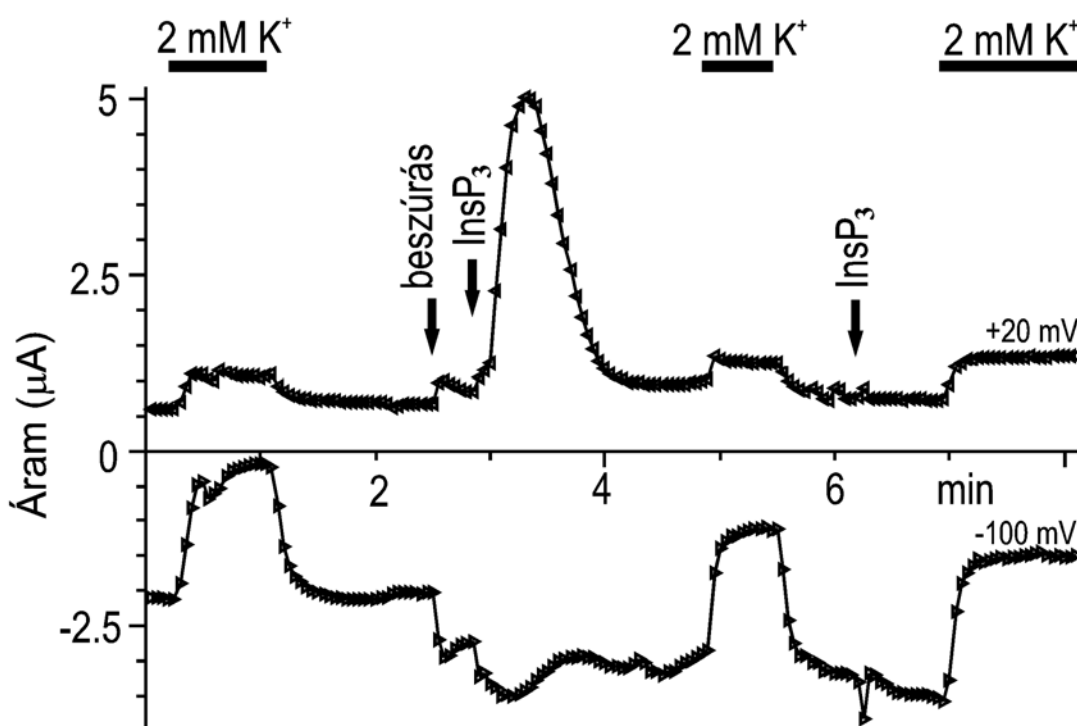
**17. ábra** A TASK-1 gátlódhat  $\text{Ca}^{2+}$ -jel hiányában és hatalmas  $\text{Ca}^{2+}$ -jellel sem jár kifejezett TASK-1 gátlás

Ezeknél a kísérleteknél TASK-1 csatornát és angiotenzin II receptort koexpresszáltunk. **(A)** A petesejteket thapsigarginnal ( $1 \mu\text{M}$ ) kezeltük 5-6.5 órán át. Az angiotenzin II (10 nM) hatását a TASK-1 áramra ( $-100 \text{ mV}$ ) és a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramra ( $+20 \text{ mV}$ ) a szokásos (ld. 11. ábra) módon mértük. A mérés végén az  $\text{EC} [\text{K}^+]$ -t 80-ról  $2 \text{ mM}$ -ra változtattuk. (Egy jellemző a 7 hasonló kísérlet közül.) **(B)** Ismételt extracelluláris ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ) hatása. A harmadik ionomycin adag után, mely már nem váltott ki feltűnő  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot, a petesejtet angiotenzin II-vel ingereltük. (Egy a négy hasonló kísérlet közül.) **(C)** Az EGTA (100 mM, 50 nl) vagy desztillált víz (kontroll) injektálás hatása az angiotenzin II-vel kiváltott TASK-1 gátlásra. A TASK-1 áramot normalizáltuk az angiotenzin II (10 nM) ingerlés kezdetén mért értékére. A görbék 11 EGTA injektált és 8 kontroll petesejt átlagát mutatják.

ionomycin kalcium ionofór a *Xenopus* petesejtekben döntően belső raktárból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást hoz létre (75). Ennek megfelelően az extracellulárisan pulzusszerűen alkalmazott ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot okozott, viszont a TASK-1-et csak kis mértékben gátolta (17. ábra, B). Ismételten adva az ionomycint, az egyre kisebb  $\text{Cl}^-$  áramokat eredményezett, míg végül a belső raktárt teljesen kiürítette.

Az ezután adott angiotenzin II (10 nM) továbbra is képes volt nagy mértékű TASK-1 gátlást ( $80\pm 1\%$ ,  $n=4$ ) létrehozni egyazon sejtben (17. ábra, B).

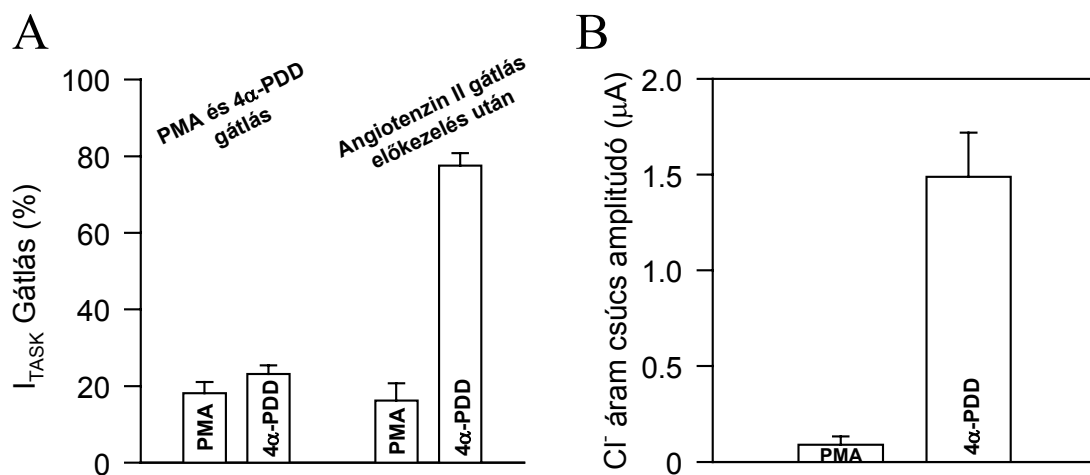
A citoplazma  $IP_3$  szintjének emelkedése a foszfolipáz C aktiváció közvetlen következménye. Így tehát megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a TASK-1 áramot az  $IP_3$ . A két elektródos feszültség clamp mérés közben egy harmadik mikrokapillárist szúrtunk a TASK-1 expresszáló oocytába, és ezen keresztül 10 ng  $IP_3$ -at injektáltunk. A vártan megfelelően az  $IP_3$  hatására hatalmas  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áram csúcs jelentkezett (+20 mV), melyet azonban TASK-1 gátlás nem kísért (-100 mV). Ha újabb 10 ng-os  $IP_3$  adagot injektáltunk, akkor arra már  $Cl^-$  áram választ sem kaptunk (18. ábra).



#### 18. ábra Az inozitol-1,4,5-triszfoszfát nem gátolja a TASK-1 áramot

*Első nyíl:* az injektáló mikrokapilláris beszúrása, mely miatt a nem specifikus csurgó áram növekedett. *Második nyíl:* 10 ng inozitol-1,4,5-triszfoszfát ( $InsP_3$ ) injektálása (hatalmas  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áram, TASK-1 gátlás nélkül). *Harmadik nyíl:* újabb 10 ng  $InsP_3$  injektálása, melynek további hatása már nem volt. Az áramokat -100 és +20 mV-on mértük a 11. ábrán ismertetett módon, azonban az EC  $K^+$  koncentrációt időnként átmenetileg 80 mM-ről 2 mM-ra változtattuk ( $I_{D80-2}$  mérés) a  $K^+$  permeabilitás pontos meghatározásához. (Egy jellemző kísérlet a 4 közül.)

A foszfolipáz C aktiválódás másik klasszikus következménye a protein kináz C (PKC) serkentése. A TASK-1 gátlást azonban nem a PKC idézi elő. A PKC gátlószer staurosporin (3  $\mu\text{M}$ ) nem befolyásolta az angiotenzin II receptoron keresztül létrejövő TASK-1 gátlást. A PKC farmakológias aktiválása szintén nem volt hatással a TASK-1 áramra. A TASK-1 áramot 12 perces forbol-észter (forbol 12-mirisztát 13-acetát, PMA, 100 nM) kezelés előtt, illetve után mértük ugyanazokon a petesejteken. Kontrollként inaktív analóggal (4 $\alpha$ -forbol 12,13-didekanoát, 4 $\alpha$ -PDD, 100 nM) kezeltünk oocytákat. Csak kicsiny, egyező mértékű  $\text{K}^+$  áram gátlás jött létre mindkét csoportban (PMA:  $18 \pm 3$  %,  $n=6$ ; 4 $\alpha$ -PDD:  $23 \pm 2$  %,  $n=6$ ), ezzel mutatva a PKC aktiváció hatástalanságát (19. ábra, A, 1. oszloppár). A PMA aktiválta a *Xenopus* oocyta PKC-t, mivel a PMA kezelés deszenzitizálta a petesejtet a kezelést követő angiotenzin II ingerlésre, mely deszenzitizációt az inaktív analóg nem alakította ki (TASK-1 gátlás deszenzitizáció: ld. 19. ábra, A, 2. oszloppár;  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram deszenzitizáció: B).



**19. ábra A PMA hatása a TASK-1 áramra, illetve az angiotenzin II-vel kiváltott TASK-1 gátlásra és  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramra**

(A) Első oszloppár: A protein kináz C serkentő PMA és az inaktív analóg 4 $\alpha$ -PDD TASK-1 gátló hatása angiotenzin II receptort és TASK-1-et koexpresszáló petesejtekben. Második oszloppár: A PMA, illetve 4 $\alpha$ -PDD előkezelést követő angiotenzin II (10 nM) ingerlés TASK-1 gátló hatása az előkezelés után maradó áram %-ában. (B) A PMA, illetve 4 $\alpha$ -PDD előkezelést követő angiotenzin II ingerléssel kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramok.

Az AT1a angiotenzin II receptorról ismert (3;27), és egyre több  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló hormonreceptorról derül ki, hogy ezek egyben tirozin kinázokat is aktiválnak. Mivel a TASK-1 C-terminálisa tartalmaz egy tirozin foszforilációs konszenzus szekvenciát, csábító volt a gondolat, hogy a gátlás tirozin foszforiláció következménye lenne.

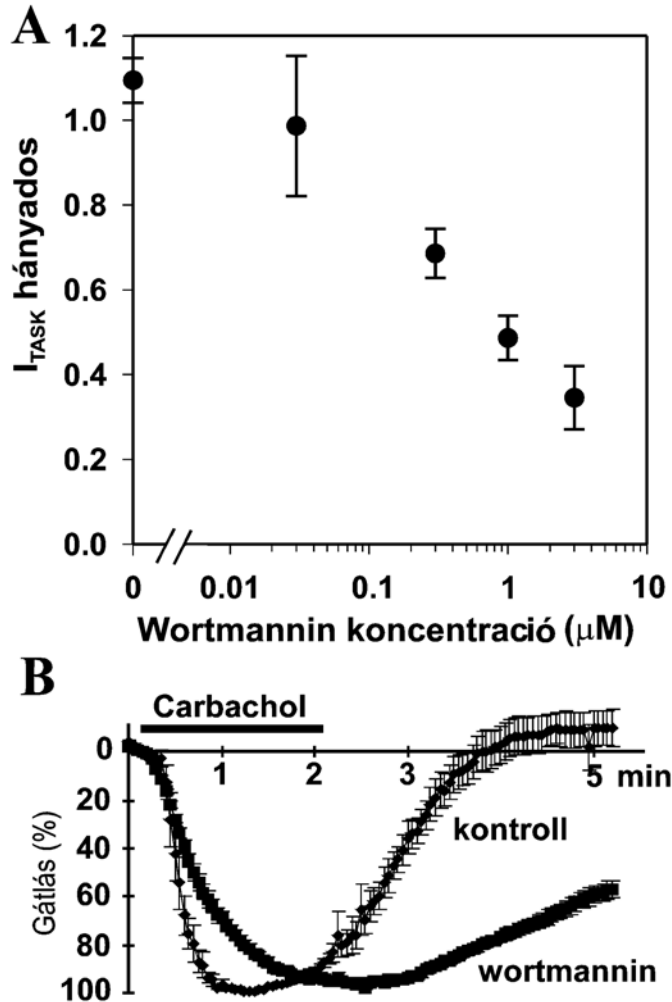
Azonban sem a nem specifikus tirozin kináz gátlószer genistein injektálása (1 mM, 50 nl) 1-2 órával a mérés előtt, sem az Src kináz specifikus PP2-vel (4-amino-5-(4-klorofenil)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-d]-pirimidine) való inkubálás (1  $\mu$ M, n=5) nem befolyásolta az angiotenzin II ingerlés (10 nM) TASK-1 gátló hatását ( $72\pm 2$  % és  $80\pm 4$  %, megfelelően). Mivel egy mindezen gátlószerekre érzéketlen tirozin kináz esetleges szerepe még így sem volt kizárható, a TASK-1 tirozin foszforilációs konszenzus szekvenciájában a tirozint *in vitro* irányított mutagenézissel fenilalaninná alakítottuk. A mutáns csatorna működött, és angiotenzin II ingerlésre ugyanúgy gátlódott, mint a vad típus, kizárva ily módon a tirozin foszforiláció szabályozó szerepének lehetőségét.

#### *Magas koncentrációjú wortmannin gátolja a TASK-1 csatornát*

A foszfolipáz C aktiválódás a második hírvivő termékek keletkezésén túlmenően a szubsztrát, a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>) szintjét is csökkenti. Mivel az enzim termékei nem okoztak TASK-1 gátlást, felmerült a lehetőség, hogy a PIP<sub>2</sub> fogyása lenne a gátlásért felelős. A wortmannin (melyet egy-két nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban a foszfatidil-inozitol 3-kináz gátlására kiterjedten alkalmaznak) magasabb,  $\mu$ M-os koncentrációban gátolja a foszfatidil-inozitol 4-kinázt is, mely a PIP<sub>2</sub> szintézis egyik kulcsenzime (49). Ezért TASK-1 csatornát expresszáló petesejtek K<sup>+</sup> áramát mértük 2-3 órás különböző koncentrációjú (0.03, 0.3, 1, 3  $\mu$ M, n=4-5 az egyes koncentrációkra) wortmannin kezelés előtt, illetve után. A wortmannin koncentrációfüggően gátolta a TASK-1 áramot (20. ábra, A), míg az oldószeres (dimetil-szulfoxid, DMSO) kontrollnak ilyen hatása nem volt.

A wortmannin megváltoztatta az M<sub>1</sub> receptor mediált TASK-1 gátlási kinetikát is. TASK-1 csatornát és M<sub>1</sub> receptort koexpresszáló petesejteket rövid ideig (25-40 min) igen magas koncentrációjú (20  $\mu$ M) wortmanninnal kezeltünk, hogy hatékony intracelluláris gátlószer koncentrációt érjünk el, még elég magas membrán PIP<sub>2</sub> szint mellett. Ez az előkezelés mintegy felére gátolta a TASK-1 áramot (DMSO kontroll csoport:  $4.1\pm 1.0$   $\mu$ A, n=8; wortmannin kezelt csoport:  $2.0\pm 0.4$   $\mu$ A, n=8). Az előkezelést követően az oocytákat 1  $\mu$ M carbachollal ingereltük 2 percig, 3  $\mu$ M wortmannin (a kontroll csoportban DMSO) jelenlétében. A wortmanninnal kezelt csoportban az áram

visszaállása a carbachol gátlás után jóval lassabb volt, mint a kontroll csoportban (20. ábra, B).



### 20. ábra A wortmannin gátolja a TASK-1 áramot

(A) TASK-1 csatornát expresszáló petesejteket wortmanninnal kezeltünk 2-3 óráig. A kezelés után és előtt mért TASK-1 áramok hányadosát számítottuk ki minden egyes petesejtre. A kontroll csoportba tartozó sejteket 0.03 % dimetil-szulfoxiddal (DMSO, a legnagyobb wortmannin koncentrációval kezelt csoportnak megfelelő) inkubáltunk. (B)  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort és TASK-1 csatornát kifejező petesejteket előkezeltünk wortmanninnal ( $20 \mu\text{M}$ ,  $n=8$ ) vagy kontrollként DMSO-val (0.2 %,  $n=8$ ) 25-40 percig. Ezt követően carbachollal ( $1 \mu\text{M}$ ) ingereltük őket. (A mérés során használt oldatok is tartalmaztak  $3 \mu\text{M}$  wortmannint vagy csak DMSO-t (0.03 %), megfelelően. Az ábrázolt gátlást a carbachol ingerlés kezdetén mért értékhez viszonyítottuk.)

## Megbeszélés

Az értekezésem alapjául szolgáló munkánk során a  $2P K^+$  csatornák szerepét vizsgáltuk mellékvese glomerulóza sejtben. Molekuláris biológiai módszerekkel kimutattuk, hogy az egyik  $2P$  csatorna, a TASK-1, nagy mennyiségben fejeződik ki glomerulóza szövetben. Reverz transzkripciós polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) nemcsak a szövetből kivont RNS-ből volt sokszorosítható specifikus TASK-1 termék, hanem gyakorlatilag minden egyedi glomerulóza sejt is TASK-1 pozitívnak bizonyult. A vizsgált szövetek közül Northern blottal a glomerulóza szövet mutatta a legmagasabb TASK-1 mRNS expressziót. Jelentős kifejeződést találtunk még a mellékvesekéreg belső rétegeit és a mellékvesevelőt tartalmazó dekapzulált mellékvesében is. Ennek a TASK-1 mRNS-nek legalább egy része a faszikuláta/retikuláris sejtekből származott, mivel az egyedi sejt RT-PCR e sejteknek is több mint felében jelzett TASK-1 mRNS expressziót. Bár a TWIK-1 és TREK-1  $2P$  csatornák is sokszorozódtak glomerulóza RNS-ből az igen érzékeny RT-PCR eljárással, Northern blottal nem voltak kimutathatók. Ebből arra következtethetünk, hogy a TWIK-1 és TREK-1 csak igen alacsony szinten expresszálódnak a glomerulóza szövetben.

A glomerulóza háttér  $K^+$  áramot és a TASK-1 áramát *Xenopus laevis* petesejtekben hasonlítottuk össze. A *Xenopus* oocyta expressziós rendszert kiterjedten használják  $K^+$  áramok vizsgálatára, és a legtöbb  $K^+$  csatorna, köztük a befelé rektifikáló csatornák számos típusa, jól kifejezhető bennük. Kevés olyan expressziós rendszer ismert, melyben egy szövetre jellemző fehérjekészlet összessége is kifejezhető. Bár a különböző fehérjék kifejeződésének mértéke és időbeli lefolyása eltérő lehet a szövetből tisztított mRNS injektálását követően, a petesejt talán a legjobb a ma elérhető lehetőségek közül az egy adott szövetre jellemző fő  $K^+$  áramnak a tanulmányozására heterolog rendszerben.

Mindenesetre szem előtt kell tartani, hogy a kifejezett fehérjék funkciójának mérését zavarhatják az endogén oocyta komponensek, sőt az expresszált fehérjékkel azok akár interakcióba is léphetnek. Általában a petesejtek a  $-40$  mV alatti feszültségtartományban csak kicsiny endogén áramokkal rendelkeznek, egy-egy oocyta preparátumon fordulnak csak elő hiperpolarizáció-aktivált  $Cl^-$  csatornák (32), melyek lassú aktivációt követően tekintélyes áramokat vezetnek negatív feszültségen. (A

zavaróan nagy hiperpolarizáció-aktivált  $\text{Cl}^-$  árammal bíró oocyta preparátumokat kizártuk a legpontosabb mérést igénylő vizsgálatainkból.)

Mindazonáltal a háttér  $\text{K}^+$  csatorna aktivitás mérésre bevezetett paraméterünk ( $I_{\text{D80-2}}$ ) kiküszöbölte a hiperpolarizáció-aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot, csakúgy mint az egyéb nem  $\text{K}^+$  áramokat, legyenek azok az oocyta endogén áramai, vagy akár a mérőelektrodok mellett folyó nem szelektív, fizikai csurgó áram. A  $-100$  mV-on  $80$  illetve  $2$  mM extracelluláris  $[\text{K}^+]$ -ban mért áramokban ugyanis a  $\text{Cl}^-$  és nem szelektív áramok egyenlő nagysággal szerepelnek, tehát ezek a  $80$  és  $2$  mM EC  $[\text{K}^+]$ -ban mért áramok különbségéből ( $I_{\text{D80-2}}$ ) kiesnek. Így tehát az  $I_{\text{D80-2}}$  a membrán  $\text{K}^+$  permeabilitásának megbízható mutatója. Igaz ez még olyan kisebb  $\text{K}^+$  áram expressziójú sejtekben is, ahol az egyéb áramok aránya is számottevő és például a  $\text{K}^+$  koncentráció változás hatására fellépő membránpotenciál eltolódás elmarad a Nernst-egyenletből számított  $\text{K}^+$  egyensúlyi potenciál eltolódástól.

A GHK áram egyenletet alaposabban szemügyre véve (1. ábra C) az is látható, hogy az erősen negatív mérőfeszültség ( $-100$  mV) miatt az  $I_{\text{D80-2}}$  a  $\text{K}^+$  permeabilitással egyenesen arányos ( $I_{\text{K}} = pF^2 \varepsilon [\text{K}^+]_{\text{EC}} / (RT)$  erősen negatív feszültségeken pontos közelítés). Mivel a kontroll petesejtek  $I_{\text{D80-2}}$  értéke ( $50$ - $100$  nA) az endogén  $\text{K}^+$  áramot jelenti, az ennél nagyobb  $I_{\text{D80-2}}$ -t az expresszált  $\text{K}^+$  csatornák alakítják ki. Ha például egy oocytában az  $I_{\text{D80-2}}$  nagyobb, mint  $1 \mu\text{A}$ , akkor ennek legalább  $90$  %-át az expresszált  $\text{K}^+$  permeabilitás okozza.

Az  $I_{\text{TASK-1}}$  (TASK-1 cRNS injektálásával kifejezett áram) és az  $I_{\text{mRNS}}$  (glomerulóza mRNS injektálásával kifejezett áram) egyaránt háttér  $\text{K}^+$  áram tulajdonságokkal rendelkezett. Aktivációs és inaktivációs kinetikát nem mutattak, és az aktuális  $\text{K}^+$  egyensúlyi potenciálnál jóval pozitívabb feszültségeken is vezettek (kifelé irányuló) áramot. A glomerulóza sejtek (41) és a TASK-1 (16;34) irodalmából vártunk megfelelően a petesejtekben kifejezett  $I_{\text{mRNS}}$  és  $I_{\text{TASK-1}}$  érzéketlen volt a klasszikus  $\text{K}^+$  csatorna gátlószere tetraetil-ammóniumra (TEA) és 4-aminopiridinre (4-AP). Magas koncentrációjú lidokain mérsékelten gátolta mindkét áramot.

A  $\text{Ba}^{2+}$  és  $\text{Cs}^+$  ionok gátlási sajátosságai az  $I_{\text{mRNS}}$  és  $I_{\text{TASK-1}}$  áramokat kialakító csatornák pórusszerkezetének nagyfokú hasonlóságát jelezték. Ezen ionok csatorna gátló hatását a pórusban elhelyezkedő kötőhelyeik tulajdonságai határozzák meg. A

nagyméretű  $Ba^{2+}$  általában nem vezetődik a  $K^+$  csatornákon keresztül, áram az iont kötő csatornán nem folyik. A  $Ba^{2+}$  gátlás azért feszültségfüggő, mert az ion kötőhelye a transzmembrán elektromos térben helyezkedik el. Minél negatívabb a sejt belseje, a pozitív töltésű  $Ba^{2+}$  annál inkább betöményedik a kötőhelye körül, így a báriumot kötő, és ezáltal gátolt csatornák részaránya emelkedik. Néhány erősen leegyszerűsítő, a csatorna pórusára vonatkozó feltételezést elfogadva (74), (például, hogy az ion csak egy helyhez kötődik a pórusban) illetve felhasználva, hogy az ionkoncentráció a transzmembrán elektromos térben (mely nem feltétlenül tükrözi egyben a geometriai viszonyokat is) Boltzmann-eloszlást követ, akár a kötőhely transzmembrán elektromos térben elfoglalt helyzete és disszociációs konstansa is kiszámítható a kísérleti adatokból (74). A  $Ba^{2+}$  ugyanabban a feszültségtartományban és hasonló mértékben gátolta az  $I_{mRNS}$  és  $I_{TASK-1}$  áramokat. Ráadásul a gátlás mindkét áramnál lassan, 1-2 másodperc alatt alkult ki a 0 mV-ról alkalmazott negatív feszültséglépés után. Ezért az  $I_{mRNS}$ -t létrehozó csatorna és a TASK-1 pórusa a  $Ba^{2+}$  kötés szempontjából megegyezik.

A  $Cs^+$  szintén a pórusba kötődve gátolja a  $K^+$  csatornákat, viszont elegendően nagy hajtóerő át is préselheti a csatornán. Ez magyarázhatja, hogy az  $I_{mRNS}$  és  $I_{TASK-1}$  erősen negatív feszültségeken, maximális  $Cs^+$  gátlás esetén sem nulla. Az  $I_{mRNS}$  és  $I_{TASK-1}$  hasonló  $Cs^+$  gátlásának feszültségfüggése meredekebb volt annál, mint ami egy ionkötőhely esetén várható lenne. Számos  $K^+$  csatorna pórusában egyidejűleg több vezetett ion is tartózkodhat, az ionok a pórusban sorban állnak, és a vezetés során egyik kötőhelyről a másikra ugranak (50). Eredményeink szerint a TASK-1 is egy ilyen csatorna, pórusában egyszerre akár két gátló  $Cs^+$  ion is kötődhet. A  $Cs^+$  ugyanabban a feszültségtartományban, hasonló mértékben gátolta az  $I_{mRNS}$  és  $I_{TASK-1}$  áramokat, és mindkét áram gátlása pillanatszerű gyorsasággal alakult ki. Eszerint a  $Cs^+$  hasonló módon gátolja az  $I_{mRNS}$ -t létrehozó és a TASK-1 csatornát.

Hogy a TASK csatorna részvételét az  $I_{mRNS}$  kialakításában más oldalról is megközelítsük, antiszenz eljárást alkalmaztunk. A TASK-1 mRNS START kodonját elfedő antiszenz oligonukleotid 85 %-ban kivédte a  $I_{mRNS}$  kifejeződését, míg a szenz nem befolyásolta azt. Az egyszálú antiszenz oligonukleotidunk ténylegesen antiszenz mechanizmussal, az mRNS-hez hibridizálva gátolta az  $I_{mRNS}$  expressziót. Ugyanis ha az antiszenz oligonukleotiddal együtt szenzet is injektáltunk, akkor az antiszenz jelentős hányada már nem az mRNS-hez, hanem a szenz oligonukleotidhoz kötődött, így az



$I_{mRNS}$  kifejeződést szignifikánsan kevésbé gátolta. Tehát az antiszenz oligonukleotid egyszálú formában hatékonyabb volt, mint a kétszálú oligonukleotid dimer.

Noha az  $I_{mRNS}$  és  $I_{TASK-1}$  elektrofiziológiai tulajdonságai, pórusaik általános farmakológiai jellemzői, illetve az antiszenz kísérlet a két áram egyezése mellett szól, az áramok pH érzékenysége mutatta, hogy mégsem lehet közük egyenlőségjelet tenni. A kevésbé pH érzékeny  $I_{mRNS}$ -nek (illetve az azzal megegyező érzékenységű, patch clammal mért glomerulóza áramnak) maximum 25-30 %-át képezheti az erősen pH érzékeny TASK-1 áram. Hogy lehetséges, hogy a TASK antiszenz oligonukleotiddal ennél nagyobb gátlást kaptunk? (Még a szenz oligonukleotiddal kivédhető, 'egyszálú specifikus' antiszenz gátlás is meghaladta a pH érzékenységekből számított %-os hozzájárulást.)

Az antiszenz oligonukleotid tervezésekor TASK (akkor még csak a TASK-nak nevezett TASK-1 volt ismert) specifikusnak bizonyult a Génbank nukleotid szekvencia adatbázisában, nem mutatott szekvencia hasonlóságot egyéb  $K^+$  csatornával. Munkánkkal párhuzamosan azonban a 2P csatornák TASK alcsoportja újabb tagokkal, a TASK-3 és TASK-5 csatornákkal bővült. A TASK-3 a START kodon környékén jelentős hasonlóságot mutat a TASK-1 bázissorrendjével. A 22 bázis hosszúságú antiszenz oligonukleotid mindössze 3 ponton tér el a TASK-3 (komplementer) szekvenciájától. A petesejtet a bennük zajló mRNS és antiszenz oligonukleotid hibridizáció közben 18 °C hőmérsékleten tartottuk, és ilyen körülmények között az antiszenz oligonukleotidunk kötődhetett a TASK-3 mRNS-hez is. Vagyis az antiszenz kísérletben a TASK-1 mellett valószínűleg a TASK-3 kifejeződést is kivédjük.

Együtt azzal az irodalmi adattal, hogy a TASK-3 enyhe extracelluláris savanyításra sokkal kevésbé gátlódik, mint a TASK-1 (30;61), jogos felvetni a lehetőséget, hogy a TASK-1 mellett a TASK-3 is jelentős mértékben fejeződik ki glomerulóza sejtben. Az önmagában működő csatornát nem képező TASK-5 alegységről Northern blottal kimutatták, hogy mRNS-e nagy mennyiségben van jelen a mellékvesekéregben (29). A mi eredményeink tükrében ez szinte sugallja, hogy az általában homodimerként működő 2P csatornák TASK alosztályában heterodimer képzés is lehetséges. Annak megállapítása nyilván további kísérleteket igényel, hogy a nagyon hasonló pórussal és egyes területeken megegyező aminosav-szekvenciával rendelkező TASK alegységek milyen arányban fejeződnek ki glomerulóza szövetben,

illetve hogy milyen kombinációkban dimerizálva hozzák létre a glomerulóza háttér  $K^+$  áramot.

Régóta ismert, hogy a glomerulóza sejt háttér  $K^+$  permeabilitását az angiotenzin II ingerlés gátolja. Kipróbáltuk, hogy ez a szabályozás átvihető-e *Xenopus* petesejtekbe a glomerulóza mRNS injektálásával. A legnagyobb expressziót mutató petesejtekben az angiotenzin II ingerlés (a várt  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áramon kívül) enyhe háttér  $K^+$  áram gátlást is létrehozott. A gátlás mértéke messze elmaradt a glomerulóza sejtben patch clampel mérhetőtől, azonban pusztán a gátlás kimutathatósága is tetszetős volt, amennyiben tekintetbe vesszük, hogy a glomerulóza szövet teljes fehérjekészletét expresszáltuk az oocytákban, melynek az angiotenzin II receptor és a háttér  $K^+$  csatornák csak egy parányi részét teszik ki.

Ha a glomerulóza háttér  $K^+$  áramért döntően TASK csatornák felelősek (legalább egy részéért TASK-1), és a glomerulóza háttér  $K^+$  áramot az angiotenzin II gátolja, akkor az angiotenzin II TASK gátló hatása várható. Ezért  $AT_{1a}$  angiotenzin II receptort és TASK-1 csatornát koexpresszáltunk petesejtekben. Az angiotenzin II hatására ilyen sejtekben erőteljes TASK-1 áram gátlás fejlődött ki. Ezzel az elsők között mutattuk ki (Millarral (48) és Talleyvel (71) egyidejűleg), hogy a TASK-1 csatorna szabályozódhat G fehérjéhez kapcsolt receptoron keresztül. Kísérletünkéből az is kiderült, hogy a receptortól a csatornáig vezető jelátviteli úthoz e két alkotóelemen kívül egyéb glomerulóza specifikus komponensre nincs szükség, vagy legalábbis azok helyettesíthetők a petesejt megfelelő elemeivel.

Végeredményben az angiotenzin II receptor sem volt feltétlenül szükséges a TASK-1 gátlás kialakításához. A petesejt endogén lizofoszfátidsav receptora is hatékony volt a csak TASK-1 csatornát expresszálo oocytákban. Ugyanígy erősen gátolni lehetett a csatornát egy harmadik fajta  $Ca^{2+}$ -mobilizáló hormon receptorral, a TASK-1-gyel koexpresszált  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptorral is. A nem  $G_q$ , hanem  $G_i$  fehérjét aktiváló  $M_2$  receptor ingerlése viszont csak sokkal gyengébb TASK-1 gátlást okozott. A foszfolipáz  $C\gamma$  izoenzimét aktiváló és ezáltal mérsékelten  $Ca^{2+}$ -mobilizáló epidermális növekedési faktor (EGF) receptor (9) is gátolta a TASK-1 csatornát kismértékben.

Munkánkkal párhuzamosan a TASK-1 glomerulóza sejten kívüli lokalizációjáról és jellemző receptor mediált szabályozásáról újabb felfedezések láttak napvilágot.

Kimutatták, hogy a kisagyi szemcsesejtekben a háttér  $K^+$  áramot TASK-1 hozza létre és e granuláris neuronok kolinerger hatásra bekövetkező depolarizációjáért elsősorban az erősen pH érzékeny TASK-1 háttér áram gátlása felelős (48). A háttér  $K^+$  áram gátlása ez esetben a szintén  $Ca^{2+}$ -mobilizáló,  $G_q$  fehérjét aktiváló  $M_3$  receptoron keresztül valósul meg (6). A TASK-1 alakítja ki továbbá a gerincevelői és agytörzsi motoneuronok erősen negatív membránpotenciálját (71). Ezeken az idegsejteken igen sokféle neurotranszmitter hatása érvényesül. Ezek közül egyesek (szerotonin, noradrenalin, P anyag, tireotrop releasing hormon (TRH) és glutamát) a háttér  $K^+$  áram gátlásával kifejezetten depolarizálnak, mely típusosan a megfelelő (5-HT<sub>2</sub> szerotonerg,  $\alpha_1$  adrenerg, NK<sub>1</sub> tachikinin, TRH-R1 és I. csoportba tartozó metabotrop glutamát)  $Ca^{2+}$ -mobilizáló receptor aktivációjának következtében történik (71). Talley és munkatársai heterolog expressziós rendszerben, HEK293 sejtekben is kimutatták a TASK-1 gátlást. A  $Ca^{2+}$ -mobilizáló tireotrop releasing hormon (TRH-R1) receptort alkalmazták TASK-1 gátlására (71).

Tehát úgy tűnt, a  $Ca^{2+}$ -mobilizáló hormon receptorok általában képesek a TASK-1 gátlás kialakítására. Ez arra ösztönzött minket, hogy a TASK-1 gátlásért felelős lépést a  $G_q$  fehérje-foszfolipáz C jelátviteli úton keressük. A G fehérje részvételét a gátlásban a nem hidrolizáló GTP analóg  $GTP\gamma S$  segítségével igazoltuk. A G fehérjék aktív formája, köztük a  $G_q$  heterotrimer G fehérje  $\alpha$  alegysége, nem tudja hasítani a hozzá erősen kötődő  $GTP\gamma S$ -t, ezért e nem hidrolizáló analóg a G fehérjéket tartósan aktív állapotban stabilizálja. A  $GTP\gamma S$  injektálás hatására a TASK-1 áram gátlódott, ami az aktív G fehérje TASK-1 gátlásban betöltött szerepét jelezte.

A  $GTP\gamma S$  azonban csak lassan gátolt, mivel feltehetően nyugalmi körülmények között a G fehérjék nukleotid kötő zsebében lévő GDP csak lassan cserélődött ki  $GTP\gamma S$ -re. Ha  $M_1$  muszkarinos acetilkolin receptort és TASK-1 csatornát koexpresszáló petesejteket injektáltunk  $GTP\gamma S$ -sel, majd a sejteket a  $GTP\gamma S$  gátlás maximumának beállta előtt ingereltük carbachollal, akkor a receptor aktiváció meggyorsította a nukleotid kötő zsebben a kicserélődést és ezáltal a  $GTP\gamma S$  kötődését a G fehérjéhez. A  $GTP\gamma S$  injektált sejtekben a carbachol megvonását követően az áram nem állt vissza kontroll értékre, hanem tartósan gátolt maradt a tartósan aktív G fehérjék TASK-1 gátló hatásának megfelelően. Ez mutatta, hogy a TASK-1 gátlásra képes G fehérjék aktiválódnak a receptor mediált TASK-1 gátlás során.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló hormon receptorok ingerlése a  $\text{G}_{q/11}$  fehérjéken keresztül serkenti a foszfolipáz C enzimet. A foszfolipáz C aktiválódása szükséges az  $\text{M}_1$  muszkarinos acetilkolin receptor TASK-1 gátló hatásához. Az U73122 foszfolipáz C gátlószer *Xenopus* petesejtekben erősen csökkentette a carbachol okozta  $\text{K}^+$  áram gátlást. Kisagyi szemcsesejtekben ugyanez a gátlószer kivédte carbachollal létrehozott  $\text{Ca}^{2+}$  jelet, de nem akadályozta meg a TASK-1 in vivo megfelelőjeként leírt háttér  $\text{K}^+$  áram gátlódását (6). Jelenleg e különbség okát nem ismerjük. Talán a TASK-1 gátlás  $\text{Ca}^{2+}$ -jelnél nagyobb érzékenysége a foszfolipáz C aktivációra, több különböző lokalizációjú és U73122 érzékenységgű foszfolipáz C izoenzim vagy valamilyen más módon az eltérő sejt típus, illetve kísérleti körülmények okozhatják a látszólag ellentmondó eredményeket.

A foszfolipáz C TASK-1 gátló hatását egy másik, a gátlószertől független megközelítés is igazolja kísérleti rendszerünkben. Az  $\text{M}_2$  muszkarinos acetilkolin receptort és TASK-1 csatornát kifejező petesejtekben a carbachol ingerlés csak kismértékű háttér  $\text{K}^+$  áram gátlást okozott. Ha viszont a receptoron és a csatornán kívül még foszfolipáz C  $\beta 2$  enzimet is koexpresszáltunk, akkor a carbachol már kifejezett TASK-1 gátláshoz vezetett. Mivel a két illetve háromféle 'idegen' fehérjét kifejező petesejt csoport között az egyedüli különbség a foszfolipáz C  $\beta 2$  expressziója volt, nyilván a foszfolipáz C idézte elő a fokozott TASK-1 gátlást.

Ha a petesejtek ritka, úgynevezett 'variáns donor' békából származtak, és nagy mennyiségű endogén  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló muszkarinos acetilkolin receptort tartalmaztak (42), a carbachol hatására a csak TASK-1 csatornát expresszáló petesejtekben is fellépett  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram és kifejezett TASK-1 gátlás. Az ilyen petesejt preparátumokat kizártuk az  $\text{M}_2$  receptorral végzett kísérleteinkből. A nem 'variáns donorból' nyert,  $\text{M}_2$  receptort és TASK-1 csatornát kifejező petesejtekben a carbachol csak gyengén gátolta a TASK-1-t, és nem járt  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  árammal, (vagy ritkán kis amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áram osszcillációkat okozott). E kicsiny  $\text{Ca}^{2+}$  jel és az enyhe TASK-1 gátlás valószínűleg szintén foszfolipáz C aktiválódás következménye volt. Ez a foszfolipáz C aktiválódás lehetett az  $\text{M}_2$  receptortól független, létrejöhetett a nem 'variáns donorból' nyert petesejtekben is (jóval kisebb mennyiségben) jelenlévő  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló muszkarinos acetilkolin receptorok miatt. De létrejöhetett  $\text{M}_2$  receptoron keresztül is, egy olyan foszfolipáz C aktivációjával, melyet az  $\text{M}_2$  receptor

által serkentett  $G_i$  fehérje  $\beta\gamma$  alegysége aktivál. (Ilyen például a *Xenopus*-ból klónozott PLC- $X\beta$  (43)). A csak  $M_2$  receptort és TASK-1 csatornát kifejező oocytákban a carbachol hatására jelentkező csekély  $K^+$  áram gátlás okát nem vizsgáltuk tovább.

Az  $M_2$  receptoron és TASK-1-en kívül foszfolipáz C  $\beta 2$  enzimet is kifejező petesejtekben a carbachol ingerlés nagy  $Ca^{2+}$  jelet és erős TASK-1 gátlást hozott létre. A nagy  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áram mutatta, hogy a foszfolipáz C  $\beta 2$  enzimet *Xenopus* petesejtekben is be lehet kapcsolni az  $M_2$  receptoron keresztül. Igazából ennek reményében választottuk a  $\beta 2$  izoenzimet vizsgálatunkhoz, hiszen más expressziós rendszerben már kimutatták (11), hogy az  $M_2$  receptor által a  $G_i$  fehérje heterotrimer komplexéből felszabadított  $\beta\gamma$  alegység hatékonyan aktiválja ezt a foszfolipáz C formát. Az, hogy a carbachol ingerlésre fokozott TASK-1 gátlás is jelentkezett, az aktív foszfolipáz C TASK-1 gátlásban betöltött szerepét igazolta.

A foszfolipáz C aktiválódás közvetlen következménye az inozitol-triszfoszfát ( $IP_3$ ) és diacilglicerin (DAG) másodlagos hírvivők képződése. Az  $IP_3$  az intracelluláris raktárakból  $Ca^{2+}$ -ot szabadít fel, majd komplikált enzimatikus reakcióutakon tucatnyi további különféle inozitol-foszfát képződhet belőle. Azonban sem a citoplazma [ $Ca^{2+}$ ] növekedése, sem az inozitol-foszfátok nem okai a TASK-1 gátlásnak. A citoplazma [ $Ca^{2+}$ ] bármely irányba történő változtatása nem befolyásolta lényegesen a TASK-1 áramot. Ha az intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktárakat a  $Ca^{2+}$ -ATPáz gátló thapsigarginnal kiürítettük, akkor a receptor ingerlés már nem okozott  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áramot, azonban a TASK-1 továbbra is gátlódott.

Változatlan nagyságú maradt a TASK-1 gátlás akkor is, ha a citoplazma  $Ca^{2+}$  koncentrációt a normális nyugalmi szint alatt stabilizáltuk magas koncentrációjú EGTA  $Ca^{2+}$ -kelátor segítségével. (Bár a gátlás sebessége csökkent, talán éppen a foszfolipáz C aktiváció [ $Ca^{2+}$ ] függése miatt.) Az  $IP_3$  közvetlen és közvetett szabályozó szerepét egyaránt kizárta az a kísérlet, melynek során TASK-1 expresszáló petesejtekbe mérés közben injektáltunk  $IP_3$ -at. A maximális  $IP_3$  adag hatására hatalmas  $Ca^{2+}$ -aktivált  $Cl^-$  áram jelentkezett, melyet azonban TASK-1 gátlás nem kísért.

A foszfolipáz C másik terméke, a DAG a protein kináz C-t aktiválja. Azonban a protein kináz C farmakológias aktivációja nem befolyásolta a TASK-1 áramot, és a protein kináz C farmakológias gátlása nem változtatta a receptor mediált TASK-1 gátlást. Ezért a protein kináz C nem vesz részt a TASK-1 gátlásban, annak ellenére,

hogy csatorna tartalmaz protein kináz C foszforilációs konszenzus szekvenciát. A protein kináz C erőteljes aktivációjának érdekében magas koncentrációjú PMA-t alkalmaztunk. Kezelésünk tényleg aktiválta a protein kináz C-t, mivel a kezelést követő angiotenzin II már nem volt hatékony, sem  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet, sem TASK-1 gátlást nem okozott. Ezen angiotenzin II-re mutatott érzéketlenséget talán az angiotenzin II receptor protein kináz C általi foszforilációja okozta (69).

A protein kináz C konszenzus szekvencián kívül a TASK-1 tartalmaz egy tirozin foszforilációs konszenzus szekvenciát is a C-terminálisán. Azonban a TASK-1 gátlás nem függ össze e hely foszforilációjával. A receptor aktivációval kiváltott TASK-1 gátlást nem befolyásolták a tirozinkináz gátlószerek. Ha a konszenzus szekvenciát úgy mutáltuk, hogy többé már nem foszforilálódhatott, a mutáns csatorna akkor is szabályozódott receptoron keresztül.

Mások eredményeivel teljesen egybehangzóan (16;34;71), a foszfolipáz C termékei és az azok által beindított jelátviteli utak nem vezetnek TASK-1 gátláshoz a mi rendszerünkben sem, logikus ezért a gondolat, hogy a foszfolipáz C szubsztrátjának fogyása lehet felelős a TASK-1 gátlásért. A foszfolipáz C aktiváció során a membrán foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát ( $\text{PIP}_2$ ) és foszfatidil-inozitol-4-foszfát (PIP) szintje jóval a nyugalmi érték alá süllyed, a párhuzamosan aktiválódó reszintézis ellenére (18;33). Bár a polifoszfoinozitidek csak egy kicsiny hányadát adják a membrán összes foszfolipid mennyiségének, mégis egyre több fehérvérjéről derül ki, hogy köti e negatívan töltött lipideket és szabályozódik általuk. A  $\text{K}^+$  csatornák közül a befelé rektifikáló családban elég általános, hogy a  $\text{PIP}_2$  kötés aktivál (25;39;67). Így tehát felmerül a lehetőség, hogy a TASK-1 csatornán is hasonló szabályozás érvényesülhet.

Az élő sejt membránjának foszfoinozitid összetételét specifikusan és receptoroktól független módon megváltoztatni nehéz feladat. Mi a petesejt membrán PIP és  $\text{PIP}_2$  szintjének csökkentésére receptortól független, de viszonylag alacsony specificitású módszert választottunk, a foszfatidil-inozitol 4-kináz (PI4K) farmakológias gátlását. A foszfatidil-inozitol 3-kináz specifikus gátlására kiterjedten alkalmazott wortmannin egy-két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban gátolja a PI4K-t is (49), mely a foszfatidil-inozitolból a PIP és ezáltal közvetve a  $\text{PIP}_2$  szintézisét teszi lehetővé. Ha a receptor ingerlés hatására jelentkező TASK-1 gátlás a polifoszfoinozitid szint

csökkenésén keresztül jön létre, akkor a polifoszfoinozitidek gyors nyugalmi körforgása miatt a PI4K gátlásnak is várhatóan TASK-1 gátlást kell okoznia.

Valóban, a wortmannin a megfelelő  $\mu\text{M}$ -os koncentráció tartományban gátolta a TASK-1 áramot. A wortmannin lelassította továbbá a TASK-1 áram visszaállását az  $M_1$  receptor ingerlés megvonását követően, mely hatás szintén várható, ha abból indulunk ki, hogy a PI4K részt vesz a receptor ingerlés következtében lebomlott polifoszfoinozitidek újraképzésében. Mivel a wortmannin az alkalmazott magas koncentrációban a PI4K-on kívül számos egyéb fehérje funkcióját is befolyásolja (70), eredményeinkből nem következik biztosan a polifoszfoinozitidek TASK-1 szabályozó szerepe. A PIP vagy  $\text{PIP}_2$  TASK-1 csatornára kifejtett hatásának igazolása további kísérleteket igényel még. A wortmanninnal kapott eredményeink azonban összhangban vannak azzal a hipotézissel, mely szerint a TASK-1 aktivitást a membrán polifoszfoinozitidek szabályozzák.

## Következtetések

A TASK-1 2P  $K^+$  csatorna nagy mennyiségben fejeződik ki patkány mellékvese glomerulóza sejtekben és hozzájárul a sejt háttér  $K^+$  permeabilitásának kialakításához. Glomerulóza szövetben több TASK-1 mRNS expresszálódik, mint a korábban a csatorna bő forrásának tartott szívben és kisagyban, azonban a glomerulóza sejt háttér  $K^+$  áramának kialakításában a TASK-1 mellett más csatornák is részt vesznek. Ezen további háttér  $K^+$  csatornák árama több szempontból nagyon hasonlóknak bizonyult a TASK-1-éhez, ezért valószínűleg ezek a csatornák is a 2P család TASK alosztályába tartoznak.

Az angiotenzin II  $AT_{1a}$  receptorán keresztül gátolja a TASK-1 csatornát. A háttér  $K^+$  áram gátlás hozzájárul az angiotenzin II depolarizáló hatásához és részét képezi a peptid által elindított összetett jelátviteli folyamatnak, melynek végeredménye a fokozott aldoszteron termelés. TASK-1 gátlást nemcsak az angiotenzin II receptor hozhat létre, hanem a gátlás általában jellemző a  $Ca^{2+}$ -mobilizáló hormon receptorokra, aminek nagy jelentősége van egyéb sejtípusok háttér  $K^+$  áram szabályozásában is.

A  $Ca^{2+}$ -mobilizáló receptorok a TASK-1 csatornát a foszfolipáz C serkentésén keresztül gátolják. A foszfolipáz C termékei nem okoznak TASK-1 gátlást. A gátlásért a membrán polifoszfoinozítid szintjének csökkenése, vagy egy ma még nem ismert jelátviteli folyamat felelős.



## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Enyedi Péternek, témavezetőmnek, aki a munkacsoportjába fogadott, megteremtette munkám feltételeit és irányította, számtalan tanáccsal segítette azt. Külön köszönet illeti őt azért, ahogy ötleteivel és töretlen optimizmusával átvezetett a sikertelen kísérletek sokszor nem ritka erdején.

Köszönöm Dr. Spät Andrásnak, hogy másodéves koromban a félévi vizsgán felfigyelt rám, intézetébe hívott és folyamatosan figyelemmel kísérte és támogatta munkámat, programvezetőként segítette értekezésem elkészítését és mindezek mellett még arra is maradt energiája, hogy alkalmanként egy-egy kiállításlátogatással csiszolja a művészetek iránti érzékemet.

Köszönettel tartozok laboratóriumunk asszisztensnőinek, Veres Irénnek és Kovács Erikának fáradhatatlan munkájukért, mely jelentős mértékben segítette elő célkitűzéseink megvalósítását. Köszönöm a 2000 nyara óta PhD tanulmányait külföldön folytatató Fischer Tamásnak, hogy a bírálók igényeinek megfelelően glomerulóza sejten végzett patch clamp mérésével kiegészítette a *Molecular Endocrinology* közleményünket és ezzel hozzájárult annak elfogadásához. Nagyra értékelem továbbá az Élettani Intézetben az összes munkatársam szerepét annak az elfogadó, baráti légkörnek a megteremtésében, melyet a tartós kutatómunka elengedhetetlen feltételének érzek.

Köszönetemet szeretném kifejezni családomnak. Hálával tartozok az édesanyám és a húgom önzetlen gondoskodásáért és a számtalan reggeliért és vacsoráért. Köszönöm édesapám támogatását és azt, hogy kutyasétáltatás közben sokszor végighallgatta még kissé homályos elképzeléseimet, illetve lényegretörésével esetenként konkrét ötletekkel is hozzájárult munkámhoz. Végül köszönetet mondok Nyírtass faluban élő nagyszüleimnek, nagyapámnak, aki gyermekkoromban megtanította nekem, hogy néha a leküzdhetetlennek tűnő akadályokon is felül lehet kerekedni.

## Irodalomjegyzék

1. **Balla T, Várnai P, Holló Z, Spät A** 1990 Effects of high potassium concentration and dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$ -channel agonists on cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 127:815-822
2. **Bang H, Kim Y, Kim D** 2000 TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore  $\text{K}^+$  channel family. *Journal of Biological Chemistry* 275:17412-17419
3. **Berk BC** 1999 Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11:S62-S68
4. **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
5. **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
6. **Boyd DF, Millar JA, Watkins CS, Mathie A** 2000 The role of  $\text{Ca}^{2+}$  stores in the muscarinic inhibition of the  $\text{K}^+$  current  $\text{IK}_{\text{SO}}$  in neonatal rat cerebellar granule cells. *J Physiol* 529 Pt 2:321-331
7. **Braha O, Edmonds B, Sacktor T, Kandel ER, Klein M** 1993 The contributions of protein kinase A and protein kinase C to the actions of 5-HT on the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current of the sensory neurons in *Aplysia*. *J Neurosci* 13:1839-1851
8. **Brauneis U, Vassilev PM, Quinn SJ, Williams GH, Tillotson DL** 1991 ANG II blocks potassium currents in zona glomerulosa cells from rat, bovine, and human adrenals. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 260:E772-E779
9. **Browaeys-Poly E, Cailliau K, Vilain JP** 1998 Fibroblast and epidermal growth factor receptor expression in *Xenopus* oocytes displays distinct calcium oscillatory patterns. *Biochim Biophys Acta* 1404:484-489
10. **Burnay MM, Python CP, Vallotton MB, Capponi AM, Rossier MF** 1994 Role of the capacitative calcium influx in the activation of steroidogenesis by angiotensin II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 135:751-758

11. **Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P** 1992 Isozyme-selective stimulation of phospholipase C  $\beta_2$  by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 360:684-686
12. **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. *Journal of Biological Chemistry* 274:7887-7892
13. **Chen XL, Bayliss DA, Fern RJ, Barrett PQ** 1999 A role for T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the synergistic control of aldosterone production by ANG II and  $\text{K}^+$ . *Am J Physiol* 276:F674-683
14. **Cohen CJ, McCarthy RT, Barrett PQ, Rasmussen H** 1988  $\text{Ca}^{2+}$  channels in adrenal glomerulosa cells:  $\text{K}^+$  and angiotensin II increase T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:2412-2416
15. **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
16. **Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M** 1997 TASK, a human background  $\text{K}^+$  channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO Journal* 16:5464-5471
17. **Durroux T, Gallo-Payet N, Payet MD** 1988 Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. *Journal of Physiology* 404:713-729
18. **Enyedi P, Büki B, Mucsi I, Spät A** 1985 Polyphosphoinositide metabolism in adrenal glomerulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 41:105-112
19. **Enyedi P, Szabó B, Spät A** 1985 Reduced responsiveness of glomerulosa cells after prolonged stimulation with angiotensin II. *Am J Physiol* 248:E209-E214
20. **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  $\text{K}^+$  channel. *EMBO Journal* 15:6854-6862
21. **Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M** 1998 A neuronal two P domain  $\text{K}^+$  channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO Journal* 17:3297-3308
22. **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  $\text{K}^+$  channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282:249-256

23. **Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N** 2001 Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2:175-184
24. **Horváth A, Szabadkai G, Várnai P, Arányi T, Wollheim CB, Spät A, Enyedi P** 1998 Voltage dependent calcium channels in adrenal glomerulosa cells and in insulin producing cells. *Cell Calcium* 23:33-42
25. **Huang CL, Feng SY, Hilgemann DW** 1998 Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by Gβγ. *Nature* 391:803-806
26. **Hunyady L, Rohács T, Bagó A, Deák F, Spät A** 1994 Dihydropyridine-sensitive initial component of the ANG II- induced Ca<sup>2+</sup> response in rat adrenal glomerulosa cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 266:C67-C72
27. **Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T** 1999 Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:544-549
28. **Kanazirska MV, Vassilev PM, Quinn SJ, Tillotson DL, Williams GH** 1992 Single K<sup>+</sup> channels in adrenal zona glomerulosa cells. II. Inhibition by angiotensin II. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 263:E760-E765
29. **Kim D, Gnatenco C** 2001 TASK-5, a new member of the tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *Biochem Biophys Res Commun* 284:923-930
30. **Kim Y, Bang H, Kim D** 2000 TASK-3, a new member of the tandem pore K<sup>+</sup> channel family. *J Biol Chem* 275:9340-9347
31. **Klein M, Camardo J, Kandel ER** 1982 Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:5713-5717
32. **Kowdley GC, Ackerman SJ, John JE3, Jones LR, Moorman JR** 1994 Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *Journal of General Physiology* 103:217-230
33. **Lee SB, Rhee SG** 1995 Significance of PIP<sub>2</sub> hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr Opin Cell Biol* 7:183-189
34. **Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DMC-R, 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

35. **Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J** 1996 TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO Journal* 15:1004-1011
36. **Lesage F, Lazdunski M** 2000 Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F793-F801
37. **Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E, Lazdunski M** 1996 Dimerization of TWIK-1 K<sup>+</sup> channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO Journal* 15:6400-6407
38. **Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M** 2000 Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids and Gs-, Gi- and Gq-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275:28398-28405
39. **Logothetis DE, Zhang H** 1999 Gating of G protein-sensitive inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Physiol (Lond)* 520 Pt 3:630
40. **Lopes CM, Zilberberg N, Goldstein SA** 2001 Block of knk3 by protons. evidence that 2-p-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem* 276:24449-24452
41. **Lotshaw DP** 1997 Characterization of angiotensin II-regulated K<sup>+</sup> conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Journal of Membrane Biology* 156:261-277
42. **Lupu-Meiri M, Shapira H, Matus-Leibovitch N, Oron Y** 1990 Two types of intrinsic muscarinic responses in *Xenopus* oocytes. I. Differences in latencies and <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> efflux kinetics. *Pflugers Arch* 417:391-397
43. **Ma HW, Blitzer RD, Healy EC, Premont RT, Landau EM, Iyengar R** 1993 Receptor-evoked Cl<sup>-</sup> current in *Xenopus* oocytes is mediated through a beta-type phospholipase C. Cloning of a new form of the enzyme. *J Biol Chem* 268:19915-19918
44. **Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honore E** 1999 TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry* 274:1381-1387
45. **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<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 19:2483-2491
46. **Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E** 2000 Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K<sup>+</sup> channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275:10128-10133

47. **Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E** 1999 Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 274:26691-26696
48. **Millar JA, Barratt L, Southan AP, Page KM, Fyffe RE, Robertson B, Mathie A** 2000 A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3614-3618
49. **Nakanishi S, Catt KJ, Balla T** 1995 A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5317-5321
50. **Neyton J, Miller C** 1988 Discrete  $Ba^{2+}$  block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel. *Journal of General Physiology* 92:569-586
51. **Patel AJ, Honore E** 2001 Properties and modulation of mammalian 2P domain  $K^+$  channels. *Trends Neurosci* 24:339-346
52. **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
53. **Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M** 1998 A mammalian two pore domain mechano-gated S-like  $K^+$  channel. *EMBO Journal* 17:4283-4290
54. **Patel AJ, Maingret F, Magnone V, Fosset M, Lazdunski M, Honore E** 2000 TWIK-2, an inactivating 2P domain  $K^+$  channel. *J Biol Chem* 275:28722-28730
55. **Payet MD, Bilodeau L, Drolet P, Ibarrondo J, Guillon G, Gallo-Payet N** 1995 Modulation of a  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel by angiotensin II in rat adrenal glomerulosa cells: Involvement of a G protein. *Molecular Endocrinology* 9:935-947
56. **Payet MD, Durroux T, Bilodeau L, Guillon G, Gallo-Payet N** 1994 Characterization of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  ionic currents in glomerulosa cells from human adrenal glands. *Endocrinology* 134:2589-2598
57. **Quinn SJ, Brauneis U, Tillotson DL, Cornwall MC, Williams GH** 1992 Calcium channels and control of cytosolic calcium in rat and bovine zona glomerulosa cells. *Am J Physiol* 262:C598-C606
58. **Quinn SJ, Cornwall MC, Williams GH** 1987 Electrical properties of isolated rat adrenal glomerulosa and fasciculata cells. *Endocrinology* 120:903-914
59. **Quinn SJ, Cornwall MC, Williams GH** 1987 Electrophysiological responses to angiotensin II of isolated rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 120:1581-1589

60. **Rajan S, Wischmeyer E, Karschin C, Preisig-Müller R, Grzeschik KH, Daut J, Karschin A, Derst C** 2001 THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K<sup>+</sup> channels. *Journal of Biological Chemistry* 276:7302-7311
61. **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<sup>+</sup> channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* 275:16650-16657
62. **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<sup>+</sup> channel from human kidney. *Journal of Biological Chemistry* 273:30863-30869
63. **Rohács T, Bagó A, Deák F, Hunyady L, Spät A** 1994 Capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in adrenal glomerulosa cells. Possible role in angiotensin II response. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 267:C1246-C1252
64. **Rossier MF, Burnay MM, Vallotton MB, Capponi AM** 1996 Distinct functions of T- and L-type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 137:4817-4826
65. **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
66. **Schrier AD, Wang H, Talley EM, Perez-Reyes E, Barrett PQ** 2001  $\alpha$ 1H T-type Ca<sup>2+</sup> channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C265-C272
67. **Shyng SL, Nichols CG** 1998 Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K<sub>ATP</sub> channels. *Science* 282:1138-1141
68. **Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, Bayliss DA** 2000 The TASK-1 two-pore domain K<sup>+</sup> channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci* 20:6347-6354
69. **Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA, Mihalik B, Jayadev S, Catt KJ** 1998 Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT<sub>1a</sub> receptor is localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol* 54:935-941
70. **Sugita Y, Nagao T, Urushidani T** 1999 Nonspecific effects of the pharmacological probes commonly used to analyze signal transduction in rabbit parietal cells. *Eur J Pharmacol* 365:77-89
71. **Talley EM, Lei Q, Sirois JE, Bayliss DA** 2000 TASK-1, a two-pore domain K<sup>+</sup> channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25:399-410

72. **Vassilev PM, Kanazirska MV, Quinn SJ, Tillotson DL, Williams GH** 1992 K<sup>+</sup> channels in adrenal zona glomerulosa cells. I. Characterization of distinct channel types. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 263:E752-E759
73. **Várnai P, Osipenko ON, Vizi ES, Spät A** 1995 Activation of calcium current in voltage-clamped rat glomerulosa cells by potassium ions. *Journal of Physiology* 483:67-78
74. **Woodhull AM** 1973 Ionic blockage of sodium channels in nerve. *Journal of General Physiology* 61:687-708
75. **Yoshida S, Plant S** 1992 Mechanism of release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in response to ionomycin in oocytes of the frog *Xenopus laevis*. *J Physiol (Lond)* 458:307-318



## Saját közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények:

1. **Czirják, G.**; Fischer, T.; Spät, A.; Lesage, F. and Enyedi, P.: TASK (TWIK-Related Acid Sensitive K<sup>+</sup> channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Molecular Endocrinology* 14(6): 863-874, (2000 Jun.). (impact factor (2000) : 6.251)
2. **Czirják, G.**; Petheő G.L.; Spät, A.; Enyedi, P.: Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 281(2): C700-8, (2001 Aug.). (impact factor (2000) : 4.086)

### Egyéb saját közlemény:

3. **Czirják, G.**; Burkhart, W.A.; Moyer, M.B.; Antal, J.; Shears, S.B.; Enyedi, P.: Cloning and functional expression of the cytoplasmic form of rat aminopeptidase P. *Biochimica et Biophysica Acta* 1444(3): 326-336, (1999 Mar.). (impact factor (1999) : 2.590)