

Az OTKA K75239 számú “A K2P típusú TASK, TRESK és feszültségfüggő kálium csatornák regulációja és fiziológias szerepe” című pályázat zárójelentése

A kutatási periódusban vizsgálataink elsődleges célja a TRESK (TWIK-related spinal cord K⁺ channel) háttér K⁺ csatorna szabályozásának és fiziológias funkciójának jobb megértése volt. Emellett számos kísérletet végeztünk a szintén háttér K⁺ csatornák közé tartozó TASK-1 és TASK-3 csatornákkal, illetve a feszültségfüggő K⁺ csatornák családjába tartozó Kv8.2 alegységgel is.

TRESK

A TRESK a két pórusdoménnel rendelkező (K2P), háttér K⁺ csatornák családjába tartozik. Az összes többi K2P csatornától eltérő, egyedi szabályozását munkacsoportunk írta le, részben a jelen kutatási periódust megelőzően, részben annak során. A jelentési periódust megelőzően kimutattuk, hogy a TRESK csatorna kalcium jel hatására a kalcium/kalmodulin-dependens protein foszfatáz kalcineurin hatására aktiválódik (1). A kalcineurin közvetlenül, a katalitikus helyétől eltérő felszínével, kötődik a TRESK csatornához, nagyon hasonló mechanizmussal, mint ahogy az NFAT transzkripció faktorhoz (2). Az NFAT a foszfatáz legismertebb szubsztrátja, amelynek defoszforilációját az immunszuppresszív terápiában kiterjedten használt kalcineurin-gátló ciklosporin és FK506 kivédi. Az ehhez hasonlóan létrejövő, kalcium-függő és immunszuppresszív szerekre érzékeny TRESK csatorna aktiváció felfedezését követően azt kezdtük vizsgálni, hogy milyen mechanizmusok ellensúlyozzák az aktivációt, a csatorna hogyan gátlódik, illetve minek hatására tér vissza az aktivációt követően a nyugalmi állapotába.

Az ezzel kapcsolatos első eredményeinket az OTKA pályázat benyújtása után, de még annak odaítélése előtt közzétettük (3). Kézenfekvőnek tűnt, hogy a kalcineurin foszfatáz által kiváltott aktivációt valamely kináz foszforiláló hatása ellensúlyozza. Mivel az ionomycinnel (kalcium-ionofórral) létrehozott aktivációt követően a TRESK áram visszatérése a nyugalmi állapotba (a továbbiakban „visszaállás”) lassult mM-os koncentrációjú Li⁺ hatására, azt gyanítottuk, hogy a közismerten Li⁺-érzékeny GSK3β kináz lehet a TRESK foszforilációért felelős. Ugyan a GSK3β kináz szerepével kapcsolatos elképzelés nem igazolódott (a csatornával koexpresszált konstitutív aktív GSK3, illetve a GSK3 szelektív gátlószere nem befolyásolták a visszaállást), a kísérletek közben feltűnt, hogy az egyes pete preparátumok esetében (melyeket rutinszerűen használunk a csatornák vizsgálatára heterolog expressziós rendszerként) a visszaállás sebessége igen nagy eltéréseket mutat. Mivel a MotifScan szekvencia elemző program a TRESK csatorna szekvenciájában 14-3-3 kötőhelyeket jósolt, felmerült a lehetőség, hogy esetleg a 14-3-3 adapter fehérje eltérő endogén expressziója lehet az eltérések hátterében (amennyiben a fehérjék közötti kapcsolat igazolható és szerepet játszik a visszaállás sebességének meghatározásában).

Kimutattuk, hogy a TRESK csatorna intracelluláris hurok régiója (a 2. és 3. transzmembrán szegmens között) valóban képes 14-3-3 kötésére. Ahogy az a 14-3-3-ra jellemző, a kötés foszforiláció-függő volt. Az RSN ζ CPE szekvenciában a második (egér TRESK-ben 264-es) szerint kellett foszforilálnunk ahhoz, hogy a kötés in vitro

létrejőjön. A 14-3-3 kötéshez szükséges *in vitro* foszforilációt először oocyta citoszollal végeztük, de protein kináz A-val is ki tudtuk váltani, ami előrevetítette, hogy a Ser264 *in vivo* is a PKA szubsztrátja lehet. Ha a *Xenopus* petesejtekben a TRESK-kel 14-3-3 η -t koexpresszáltunk, a visszaállás lelassult, míg domináns negatív 14-3-3 η hatására felgyorsult. A koexpressziós megközelítés mellett az 14-3-3 szerepét oly módon is alátámasztottuk, hogy az endogén 14-3-3 kötődését egy blokkoló foszfopeptid (pS-Raf259) mikroinjektálásával megakadályoztuk. Ez a beavatkozás szintén drámai módon gyorsította visszaállást, igazolva a 14-3-3 TRESK szabályozásban betöltött szerepét. A hét ismert 14-3-3 izoformát (mind a vad típust, mind a domináns negatív hatású mutáns formát) megklónoztuk és teszteltük: közülük (koexpressziós kísérletekben) az η és γ hatékonyak bizonyult, míg a δ , ϵ , ζ , τ , σ altípusok nem (3).

Eddigre már ismertté vált, hogy a 14-3-3 más K2P csatornához (a TASK1-hez és TASK3-hoz) kötődik, de az általunk detektált 14-3-3 hatás ezektől merőben eltérő volt. Míg a 14-3-3 kötődése a TASK csatornák C-terminálisának végéhez a csatornák plazmamembránba való kihelyeződésének előfeltétele (4), addig a 14-3-3 kötése a TRESK intracelluláris hurok régiójához a csatorna egyedi kalcium-függő szabályozását modulálja, késlelteti a csatorna visszatérését a nyugalmi (gátolt) állapotba (3).

A 14-3-3 visszaállást késleltető hatása egyértelmű, jól reprodukálható kísérleti eredmény volt, amire magyarázatot kerestünk. Feltételeztük, hogy a 14-3-3 kapcsolódása a foszforilált Ser264-hez akadályozza annak (az egyelőre ismeretlen) kináznak a csatornához kötődését, illetve a csatornára kifejtett hatását, ami a kalcineurin által defoszforilált (Ser264-től eltérő) aminosav maradék(ok) (újra-)foszforilációjáért és ezáltal a csatorna gátlásáért felelős. E modell alapján úgy véltük, hogy a 14-3-3 formájában egy olyan moduláló tényezőt azonosítottunk, mely ugyan beleszól a visszaállás sebességének meghatározásába, azonban az azért felelős kinázról további információt nem hordoz.

Így tehát tovább folytattuk a TRESK-et gátló kináz enzim keresését. Ilyen irányú törekvéseink során (különböző munkahipotézisek, farmakológiai eredményeken alapuló sejtek és szekvencia analízáló programok jóslatai alapján) több mint 20 különböző szerin/treonin-kinázt klónoztunk meg (pl. GSK3 β , CK2, PKC ζ , CaMKII β , ERK2, GRK2, PKB, CDK1, PLK1, TGF β RI és II, C-Raf1, AMPK α 1, Chk1, MEK1), illetve képeztük azoknak konstitutívan aktív formáját *in vitro* mutagenézissel. Típusos kísérletünkben ezeknek a kinázoknak (konstitutívan aktív és/vagy vad típusú formáját) koexpresszáltuk a TRESK csatornával *Xenopus* petesejtekben (esetenként domináns negatív 14-3-3-mal együtt, a 14-3-3 visszaállást gátló hatásának kivédésére). Azt vártuk, hogy a megfelelő kináz koexpressziójával a TRESK áram visszaállása az ionomycin ingerléssel kiváltott aktivációt követően felgyorsítható. Azonban a fenti kinázok egyikének koexpressziójával sem tudtunk visszaállás gyorsulást kimutatni.

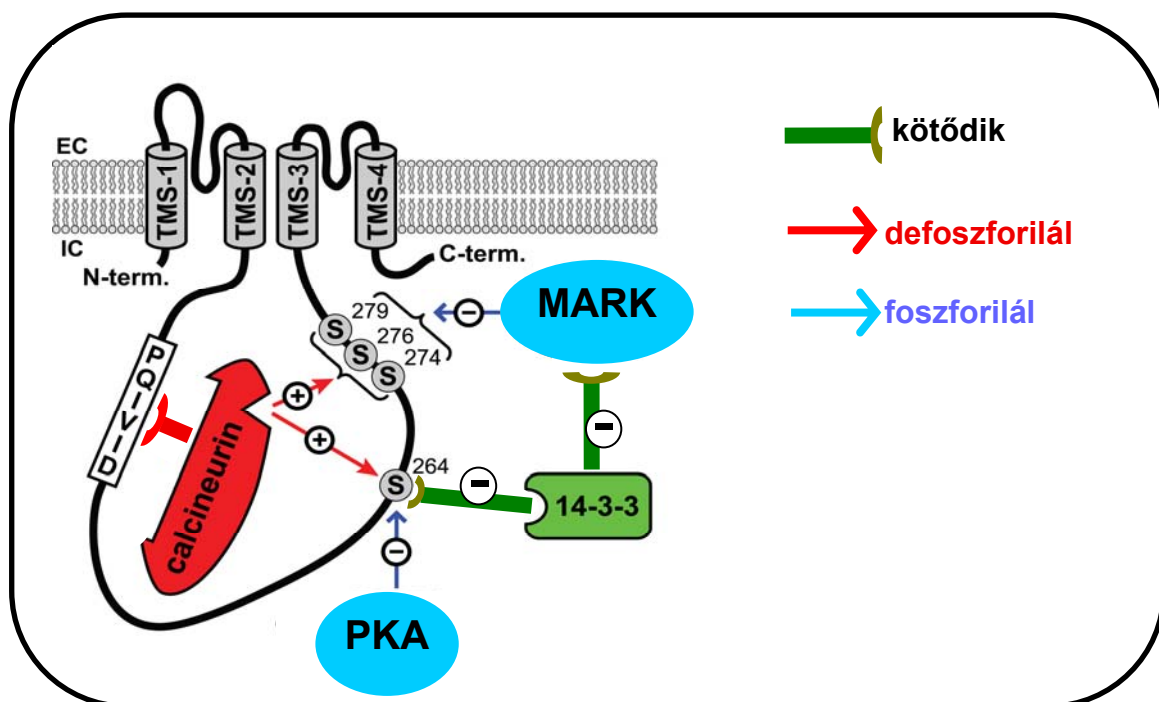
Időközben azonban az egyik 14-3-3 hatást vizsgáló kiegészítő kísérletünk meglepő eredményt hozott, mely alapján változtatta meg a 14-3-3-ról kialakított korábbi képet (5). Megvizsgáltuk ugyanis a Ser264Ala mutáns TRESK áramának visszaállási sebességét. Az előző modell alapján ennek gyors visszaállást kellett volna mutatnia hiszen a mutációval lehetetlenné tettük a 14-3-3 kihorgonyzódását a csatornához (ami a modell szerint a kináz kötődését akadályozó tényező lett volna). Ezzel szemben a Ser264Ala mutáns áramának visszaállási sebessége lassú volt, valójában még a vad típusú TRESK áramának visszaállásánál is lassúbb. Ennek az anomáliának a felismerése egyenesen vezetett ahhoz a kísérlethez, melyben megvizsgáltuk, vajon a 14-3-3 tudja-e

befolyásolni (az elroncsolt 14-3-3 kötőhellyel rendelkező) Ser264Ala mutáns szabályozását. Várakozásunkkal ellentétben (a vad típusú csatornához hasonlóan) a domináns negatív 14-3-3 koexpressziója (és a pS-Raf259 mikroinjektálás is) gyorsította a Ser264Ala mutáns áramának visszaállási sebességét (5). Ebből tehát az adódott, hogy a 14-3-3 visszaállást gátló hatása nem alapulhat kizárólag azon, hogy az adapter protein kötődik a csatorna Ser264-es régiójához, következésképpen felmerült az a lehetőség, hogy a 14-3-3 (a TRESK-hez kötődésétől függetlenül) gátolhatja a TRESK szabályozásért felelős kinázt. Ennek a kísérletsorozatnak az egyik hozadéka tehát az volt, hogy figyelmünket ráirányította azokra a kinázokra (ld. alább), melyekről az irodalomból ismert volt, hogy a 14-3-3 gátolja őket.

Másrészt a S264A mutáns nem várt viselkedése arra készítetett bennünket, hogy a TRESK szabályozásban szerepet játszó szerinekét célzó mutánsainkat tüzetesen megvizsgáljuk 14-3-3 hatás szempontjából (5). (Ezt a négy szerint: S264, S274, S276, S279 az egér TRESK hurok régiójában (melyek a humán TRESK-ben is konzerváltak) korábban a csatorna összes intracelluláris szerin és treonin aminosavára kiterjedő alanin pásztázó mutagenézissel azonosítottuk.) Ezekben a kísérletekben a foszfoszerint "utánzó" glutamát mutánsokat használtuk, mivel a Ser276Ala mutáns csatorna konstitutívan aktív, így annak kalcium-függő szabályozása nem vizsgálható. Ezekből a kísérletekből az a valószínű kép kristályosodott ki, mely szerint a S264-et és a S274, S276, S279 aminosavak által meghatározott clustert (továbbiakban S276 cluster) két különböző kináz foszforilálja, és ezeknek a TRESK csatornán konvergáló szabályozási utaknak a viszonya a 14-3-3-hoz eltérő. A S264 foszforilációja hozzájárul a csatorna gátlásához, ezt az aminosavat *Xenopus* petesejtben is foszforilálja az endogén protein kináz A. A foszforilációt követően a 14-3-3 a csatorna e motívumához kötődik ezzel fokozza a gátlás mértékét. A S276 clustert (melynek foszforilációja ugyancsak gátlást eredményez) nem a PKA foszforilálja. Az (ekkor még nem azonosított) S276 clusterre ható kinázzról azonban egyértelművé vált, hogy aktivitást a 14-3-3 gátolja. Ezzel a képpel összhangban (a cAMP szintet emelő és PKA-t aktiváló) forskolin+IBMX kezelés gyorsítja az S276E mutáns visszaállását (melyben a reguláció a S264 foszforilációján keresztül érvényesül). A forskolin+IBMX viszont nem befolyásolja az S264E mutáns visszaállását (ahol a szabályozást csak az S276 cluster valósíthatja meg). A 14-3-3 overexpresszió gátolja a S276E mutánst (és fokozza a kalcium jellel indukálható aktiváció mértékét), azonban nem befolyásolja az aktivációt követő visszaállás relatív sebességét (a 14-3-3 gátolja a csatornát, de nem hat a S264-t foszforiláló kinázra). Az S264E mutánst viszont a domináns negatív 14-3-3 gátolja (és fokozza a kalcium jellel indukálható aktiváció mértékét), és emellett a visszaállást is gyorsítja (a 14-3-3 eliminációja aktiválja a S276 clustert foszforiláló kinázt, és ezen keresztül gátolja a csatornát). A vizsgálataink nyomán kibontakozó kép illusztrálja a TRESK foszforilációs szabályozásának komplexitását, és felveti azt az egyelőre nagyon nehezen megközelíthetőnek tűnő kérdést, hogy a két azonosított foszforilációs úton keresztül milyen mechanizmusok befolyásolják a csatorna aktivitást a csatorna natív lokalizációjában (5).

Tekintettel a S276 clustert foszforiláló kináz 14-3-3 érzékenységeire vonatkozó elgondolásunkra, az irodalomból megpróbáltuk azt a 14-3-3 által gátolt kinázt kiválasztani, mely a legvalószínűbben foszforilálhatja a TRESK csatornát. Így jutottunk el a MARK2 (Microtubule-associated-protein/microtubule Affinity Regulating Kinase 2) klónozásához. A MARK2 koexpressziója a csatornával felgyorsította a TRESK áram

visszatérését a nyugalmi, gátolt állapotba, a kalcium jellel kiváltott aktivációt követően (6). Emellett, a MARK2 gátolta a csatorna bazális áramát és ennek megfelelően fokozta az kalcium jel hatására kialakuló aktiváció mértékét (esetenként 30-szoros növekedés), tehát minden tekintetben teljesítette a TRESK gátlás kritériumait. In vitro radioaktív foszforilációs kísérletben igazoltuk, hogy az E. coli-ban termeltetett, majd onnan tisztított GST-MARK2 (vagy Trx-His6-MARK2) enzim a S276 clustert foszforilálja. Ugyanezek a fehérje preparátumok Xenopus petesejtbe mikroinjektálva (a koexpressziós kísérletekhez hasonlóan) gyorsították a TRESK áram visszaállását. Végül tehát sikerrel azonosítottunk egy kinázt, amely a S276 cluster direkt foszforilációjával a TRESK gátlást létre tudja hozni (6). Eredményeink alapján a TRESK szabályozásától kialakított kép így a következő:



Mivel a MARK2 az AMP-aktivált kinázokkal rokon kinázok (AMPK α K) egyike, e család minden alcsaládjának megklónoztunk egy képviselőjét, továbbá a MARK alcsalád mind a négy tagját, és ezeket a kinázokat is koexpresszáltuk a TRESK csatornával. A MARK alcsaládon belül a MARK1, MARK2 és MARK3 hatékonynak bizonyult, a MARK4 azonban nem. Az egyéb alcsaládokból az AMPK α 1, a NUAK1, a MELK, illetve a csonkolt SIK1(1-343) konstrukcióink egyike sem gyorsította a visszaállást (6). Az eredmények alapján tehát, az AMPK rokon kinázok nem képesek általánosan regulálni a TRESK-et, ez kizárólag a MARK alcsalád egymáshoz leginkább hasonlító három tagjára jellemző.

A TRESK a MARK kinázok elsőként megismert ioncsatorna szubsztrátja. Habár a MARK kinázok irodalma kiterjedt, hiszen ezek a kinázok alapvetően felelősek pl. a mikrotubulus rendszerek stabilitásának és transzport-tulajdonságainak szabályozásáért a

mikrotubulus-asszociált proteinek (pl. az Alzheimer kór miatt közismert Tau vagy MAP-2) foszforilációján keresztül (7), eddig senki nem írta le, hogy ioncsatorna hatásaik lennének. A másik nagy terület a mikrotubulus szabályozáson kívül, ahol a MARK kinázok jelentősége ismert, a sejtpolaritás fenntartása (mind epithel, mind idegsejtekben). Ez utóbbi funkció kapcsán (apikális és bazolaterális membránok elkülönítése) általánosan elfogadott, hogy a kináz plazmamembránhoz lokalizálódik. A MARK ismert elhelyezkedése alapján tehát könnyen az ioncsatornák közvetlen közelébe férközhet.

Xenopus heterolog expressziós rendszerünkben az expresszió mértéke a mikroinjektált cRNS mennyiségének beállításán keresztül szabályozható. Tapasztalataink szerint a TRESK visszaállítás szignifikáns gyorsításához igen kis mennyiségű MARK2 cRNS (0.16 ng/oocyta) elegendő, ami valószínűsíti, hogy a hatás nem a kináz masszív overexpresszióján alapul. Mindezek azt sugallják, hogy a MARK más rendszerekben is szabályozhatja a TRESK-et. Mivel azonban a TRESK gátlás mechanizmusát sem natív sejtekben, sem egyéb heterolog rendszerben nem tudtuk megnyugtató módon vizsgálni a jelentős metodikai akadályok miatt, jelenleg nem állíthatjuk biztosan, hogy a TRESK csatorna és a MARK kináz interakciója fiziológiásan is megvalósul. Hasonlóképpen nyitott kérdés marad, hogy az emlősökben jellemző több mint 300 szerin/treonin kináz között van-e még olyan, amely a MARK-hoz hasonlóan hatékonyan gátolja a TRESK áramot. Bármi is legyen azonban ezekre a kérdésekre a válasz a jövőben, kísérleteinkben egyértelműen bizonyítottuk a TRESK csatorna jelentős foszforilációs szabályozását, és a MARK kinázok formájában jó eszközt találtunk a TRESK csatorna további vizsgálatához. Ezen túlmenően, munkánknak köszönhetően, a MARK kinázok a TRESK in vivo foszforilációs szabályozására irányuló további vizsgálatokban esélyes jelöltként indulnak.

A TRESK szabályozásáról elért eredményeinket a közelmúltban egy összefoglaló tanulmány formájában is megjelentettük (8). Ebben az összefoglalóban kitérünk a TRESK csatorna mutáció és a migrén betegség (mások által leírt) feltételezett összefüggésére (9), illetve az ezzel kapcsolatos elméleti megfontolásokra. A jelentési időszakban megjelent ezen kívül egy átfogó tanulmányunk a K2P csatornák élettanáról a terület egyik vezető folyóiratában (10), melyet azóta a K2P csatorna irodalomban kiterjedten használnak forrásként (Cit:116).

A TRESK natív expressziójának meghatározása céljából többféle módszerrel próbáltunk ellenanyagot előállítani (e területen a továbblépés komoly gátját jelenti a forgalmazott ellenanyagok nem megfelelő minősége). A legígéretesebbnek az a próbálkozásunk a tűnt, amikor a csatorna teljes intracelluláris hurokrégiója ellen termeltettünk poliklonális ellenanyagot majd ezt affinitáskromatográfiával tisztítottuk, olyan hordozóra kötött peptidsorozattal (20 peptid), melyek lefedték a teljes immunizáló fehérje szekvenciát. A tisztított ellenanyagfrakciók közül kettő megfelelőnek bizonyult overexpresszázó rendszerben a csatorna megfelelő detektálására, azonban a natív csatorna megbízható kimutatására még ezeket sem tartottuk alkalmasnak (annak ellenére, hogy sokkal szelektívebbek és érzékenyebbek voltak a kereskedelemben kapható ellenanyagoknál).

Elhatároztuk, hogy a detektálási probléma megoldására (ami nemcsak a TRESK, hanem más K2P csatornák esetében is nehezen megkerülhető) egy más megközelítést próbálunk alkalmazni. Knock out kísérleti állatmodellek és létrehozásának egy új módszerében a genomális DNS egy adott szakaszához specifikusan kötődő, és azt hasító

u.n. transcription activator like effector nuclease-okat (TALEN-eket) alkalmaznak. A DNS elhasítását követően a sejt „kijavítja” a törött DNS-t de eközben olyan hibák keletkeznek (nem homolog vég egyesítés), melyek adott esetben kereteltolódást okoznak megakadályozva a megcélzott fehérje képződését. E módszer kiterjesztése, hogy a sérült DNS környékén sokszorosára nő a homolog rekombináció valószínűsége így a megcélzott helyre tervezett módosítás is bevihető. E módszert próbáltuk a TRESK fehérje esetében alkalmazni, megterveztük és előállítottuk a TALEN konstrukciókat, szövettenyészetben ellenőriztük a hatékonyságukat. A TALEN-ek jelentős arányban módosították a tenyésztet sejtjeiben a genomiális TRESK szekvenciát. Ugyanezen TALEN-ek egér zigótákba való injektálása (a KOKI Géntechnológiai Részlegével való együttműködés keretében) a megszületett egerek egy részében a TRESK egyik alléljának módosulását eredményezte sőt ez a változás öröklődött az F1-es generációban. A TRESK KO egerek mellett a fő cél, hogy a módszer kiterjesztéseként a következő lépésben egy kisméretű fluoreszcens „tag”-et kapcsoljunk a TRESK-hez. Tekintettel arra, hogy ennek a megjelölt fehérjének az expresszióját is az eredetivel teljesen megegyező promóter szabályozza, reméljük, hogy ez a megközelítés közelebb visz a natív fehérje expressziójának feltérképezéséhez, illetve a TRESK funkciójának jobb megismeréséhez.

TASK

Bár több kísérletsorozatot is végeztünk, ebben a témakörben nem közöltünk eredményt a jelentési periódusban. A TASK-1 csatornáról 2001-ben írtuk le, hogy Gq fehérje kapcsolt receptorok általi gátlásáért a foszfolipáz C aktiválódása felelős (11), és felvetettük azt a hipotézist, hogy a csatorna gátlás a membrán PIP₂-depléciója miatt alakul ki (11,12). A foszfolipáz C szerepét azóta többen megkérdőjelezték, és mostanra az az általános nézet vált elfogadottá, hogy a PIP₂ nem játszik szerepet a TASK szabályozásában (13). Egyes elképzelések szerint a TASK gátlásért a Gq fehérje α alegységnek a csatornához való közvetlen kötődése a felelős (14), mások szerint a csatornát a protein kináz C gátolja (15-17). A közelmúltban megjelent egy közlemény, amely egyetért a foszfolipáz C szerepével a folyamatban, de a PIP₂ és a PKC hatását kizárja (18). Úgy tűnik tehát, a TASK-1 gátlás mechanizmusa több, mint egy évtizednyi intenzív kutatás után sem tekinthető véglegesen tisztázottnak. A jelentési periódusban további olyan eredményeket értünk el (a gyakran kritizált farmakológiai megközelítés helyett antiszenz technikák alkalmazásával), melyek a foszfolipáz C szerepét a gátlási folyamatban megerősítik. Mi tehát továbbra is úgy véljük, hogy a foszfolipáz C aktiválódása hozzájárul a TASK gátláshoz. A vizsgálatot a továbbiakban ki szeretnénk egészíteni azzal, hogy megvizsgáljuk, vajon a csatorna és az aktivált Gq α alegység interakciója odairányítja-e a csatorna közvetlen közelébe a Gq α által szabályozott kulcsenzimet a foszfolipáz C-t. Amennyiben egy ilyen „ternary complex” kialakul, a foszfolipáz C a csatorna környezetében tudna fokozott aktivitást kifejteni, így lokálisan erőteljesebb hatást kifejteni (legyen ez akár a PIP₂ bomlás, akár valamely második hírvívő keletkezése).

Kv8.2

A Kv8.2 (KCNV2) feszültségfüggő K⁺ csatorna alegység kifejeződését a fotoreceptor sejtekben és a Kv2.1/Kv8.2 heteromer speciális elektrofiziológia tulajdonságait 2007-ben közöltük (19). A homotetramer Kv8.2 nem vezetett áramot,

jellemeztük viszont a Kv2.1/Kv8.2 heteromer csatorna speciális tulajdonságait (19). A Kv8.2 alegység mutációját emberben kapcsolatba hozták a szupernormális pálcika elektroretinogrammal társult retina degenerációval (cone dystrophy with supernormal rod response (CDSSR)). A Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikájával kollaborációban két ilyen tüneteket mutató beteget és azok családját vizsgáltuk. Egyik esetben pontmutációk, a másikban compound heterozigóta formában egy pontmutáció mellett a másik allélon egy nagyobb DNS szakasz deléciója eredményezte a recesszív öröklődésű betegség manifesztációját. Eredményeinket egy nagyobb tanulmány részeként kollaborációs partnereinkkel együtt publikáltuk a *Human Mutation* folyóiratban (20). A tanulmány rámutatott arra, hogy a CDSSR betegség gyakoribb lehet a klinikailag dignosztizált eseteknél. A publikáció kiegészítő vizsgálata alátámasztotta korábbi megállapításunkat, miszerint a Kv2.1/Kv8.2 heteromerizáció szükséges a Kv8.2 funkciójának érvényesüléséhez.

Irodalomjegyzék

1. Czirják, G., Tóth, Z. E., and Enyedi, P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 18550-18558
2. Czirják, G. and Enyedi, P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 14677-14682
3. Czirják, G., Vuity, D., and Enyedi, P. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 15672-15680
4. Renigunta, V., Yuan, H., Zuzarte, M., Rinne, S., Koch, A., Wischmeyer, E., Schlichthorl, G., Gao, Y., Karschin, A., Jacob, R., Schwappach, B., Daut, J., and Preisig-Muller, R. (2006) *Traffic* **7**, 168-181
5. Czirják, G. and Enyedi, P. (2010) *J. Biol. Chem.*
6. Braun, G., Nemcsics, B., Enyedi, P., and Czirják, G. (2011) *PLoS. One.* **6**, e28119
7. Matenia, D. and Mandelkow, E. M. (2009) *Trends Biochem. Sci.* **34**, 332-342
8. Enyedi, P., Braun, G., and Czirják, G. (2012) *Mol. Cell Endocrinol.* **353**, 75-81
9. Lafreniere, R. G., Cader, M. Z., Poulin, J. F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafreniere, F., McLaughlan, S., Dube, M. P., Marcinkiewicz, M. M., Ramagopalan, S., Ansoorge, O., Brais, B., Sequeiros, J., Pereira-Monteiro, J. M., Griffiths, L. R., Tucker, S. J., Ebers, G., and Rouleau, G. A. (2010) *Nature Medicine* **16**, 1157-U1501
10. Enyedi, P. and Czirják, G. (2010) *Physiol Rev.* **90**, 559-605
11. Czirják, G., Petheő, G. L., Spat, A., and Enyedi, P. (2001) *Am. J. Physiol Cell Physiol* **281**, C700-C708
12. Lopes, C. M., Rohács, T., Czirják, G., Balla, T., Enyedi, P., and Logothetis, D. E. (2005) *J. Physiol* **564**, 117-129
13. Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R., and Oliver, D. (2011) *J. Physiol*
14. Chen, X., Talley, E. M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W. E., Dong, B., Viana, F., Garrison, J. C., and Bayliss, D. A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 3422-3427
15. Barbuti, A., Ishii, S., Shimizu, T., Robinson, R. B., and Feinmark, S. J. (2002) *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **282**, H2024-H2030

16. Besana, A., Barbuti, A., Tateyama, M. A., Symes, A. J., Robinson, R. B., and Feinmark, S. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 33154-33160
17. Harleton, E., Besana, A., Comas, G. M., Danilo, P., Jr., Rosen, T. S., Argenziano, M., Rosen, M. R., Robinson, R. B., and Feinmark, S. J. (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 2829-2838
18. Schiekel, J., Lindner, M., Hetzel, A., Wemhoner, K., Renigunta, V., Schlichthorl, G., Decher, N., Oliver, D., and Daut, J. (2012) *Cardiovasc. Res.*
19. Czirják, G., Tóth, Z. E., and Enyedi, P. (2007) *J. Neurophysiol.* **98**, 1213-1222
20. Wissinger, B., Schaich, S., Baumann, B., Bonin, M., Jagle, H., Friedburg, C., Varsanyi, B., Hoyng, C. B., Dollfus, H., Heckenlively, J. R., Rosenberg, T., Rudolph, G., Kellner, U., Salati, R., Plomp, A., De, B. E., Andrassi-Darida, M., Sauer, A., Wolf, C., Zobor, D., Bernd, A., Leroy, B. P., Enyedi, P., Cremers, F. P., Lorenz, B., Zrenner, E., and Kohl, S. (2011) *Hum. Mutat.* **32**, 1398-1406