

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Fehér Ádám

**Feszültség-kapuzott kationcsatornák vizsgálata humán
sejteken fiziológias és patológias állapotokban**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Feszültség-kapuzott kationcsatornák vizsgálata humán sejteken fiziológiás és patológiás állapotokban

Dr. Fehér Ádám

Témavezető: Dr. Varga Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. ELŐSZÓ	7
2. BEVEZETÉS	8
2.1 A humán B sejtek ioncsatornái	8
2.2 A feszültség-kapuzott nátriumcsatorna család (szerkezet és funkció)	11
2.3 A glioblasztóma és az U-87 sejtvonala	14
2.4 A K_{Ca}1.1 ioncsatorna szerepe a glioblasztóma inváziójában	16
2.5 A K_{Ca}1.1 ioncsatorna szerkezete és funkciója	18
2.6 A K_{Ca}1.1 ioncsatorna modulátorai	21
3. CÉLKITŰZÉS	24
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
4.1 Anyagok	25
4.2 Sejtek izolálása	25
<i>4.2.1 Primer glioblasztóma (GBM) sejtek</i>	25
<i>4.2.2 Humán perifériás B sejtek</i>	25
4.3 Primer GBM és U-87 GM sejtek tenyésztése	26
4.4 Csendesítés siRNS alkalmazásával	26
4.5 Elektrofiziológiai mérések	27
<i>4.5.1 Mérési rendszer felépítése</i>	27
<i>4.5.2 Elektrofiziológiai mérések során használt oldatok</i>	28
<i>4.5.3 Feszültség- és áramprotokollok</i>	29
<i>4.5.4 Az adatok kiértékelése</i>	30
4.6 Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)	31
<i>4.6.1 GBM sejtek</i>	31
<i>4.6.2 B sejtek</i>	32
4.7 Western blot (WB)	33
4.8 Sejtszinkronizáció és áramlási citometria	34
4.9 Statisztikai analízis	34
4.10 Szerző hozzájárulása	34
5. EREDMÉNYEK	35

5.1 A feszültség-kapuzott nátriumcsatornák jelen vannak a humán B sejt membránjában	35
5.2 A B sejt Na_v csatornák biofizikai paramétereinek meghatározása	35
5.3 A B sejteken mérhető nátriumáram TTX érzékeny	38
5.4 Membránpotenciál mérések az Na_v csatornák potenciális kanonikus funkcióját mutatják ...	38
5.5 RT-qPCR megerősítette több Na_v izoforma kifejeződését.....	41
5.6 A $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ a domináns káliumcsatorna a glioblasztóma sejtmembránjában	42
5.7 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ béta alegység-függő modulátorok tesztelése	44
5.8 A molekuláris biológiai módszerekkel kapott eredmények alátámasztják a $\beta 3$ expresszióját	46
5.9 A $\beta 3$ funkcionálisan kifejeződik az U-87 MG sejtek membránjában.....	50
5.10 A $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ expresszió sejtciklusfüggése	52
6. DISZKUSSZIÓ	55
6.1 Funkcionális Na_v ioncsatornák jelen vannak a humán B sejt membránjában	55
6.1.1 Elektrofiziológiai és molekuláris biológiai adatok bizonyítják a Na_v ioncsatornák expresszióját humán B sejtekben	55
6.1.2 A Na_v csatornák lehetséges funkciója a humán B sejtekben	56
6.2 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}/\beta 3$ komplexek funkcionálisan kifejeződnek a glioblasztóma sejtmembránban	58
6.2.1 A $\beta 3$ a domináns járulékos alegység.....	58
6.2.2 A $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ expresszió sejtciklus-függése.....	61
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	63
8. SUMMARY	64
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	65
10. TÁRGYSZAVAK	66
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	67

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA: Arachidonsav

AP: akciós potenciál

BCR: B sejt receptor

CAMKII: Kalcium/kalmodulin dependens protein kináz II

Cav1: Feszültség-kapuzott kalciumcsatorna

cDNS: Komplementer DNS

CHO: Kínai hörcsög ovárium sejtek

Ct: Küszöb ciklus

DTT: Ditiotreitol

FLS: Fibroblaszt-szerű szinoviociták

GBM: Multiform glioblasztóma

IbTx: Ibertyotoxin

IgD: Immunglobulin D

H_v1: Feszültség-kapuzott protoncsatorna

K_{Ca}: Kalcium-aktivált káliumcsatorna

K_d: Disszociációs konstans

K_v: Feszültség-kapuzott káliumcsatorna

LCA: Litokólsav

MÁH: Maradó áramhányad

Nav / Nav1: Feszültség-kapuzott nátriumcsatorna

p_o: Ioncsatornák nyitási valószínűsége

Pax: Paxilline

PBS: Foszfát-puffer

PD: Pórus domén

qPCR: Kvantitatív polimeráz láncreakció

SSI: „steady state inactivation”/inaktiváció feszültségfüggése

τ_i : Ionáram inaktiváció időállandója

τ_v : Inaktivációból való visszatérés időállandója

TCR: T sejt receptor

TRP: Tranziens receptorpotenciál csatorna

TTX: Tetrodotoxin

U-87 MG: Uppsala-87 Malignant Glioma sejtvonat

V_{50} : 50%-os nyitási valószínűséghez tartozó feszültség

VSD: feszültség-érzékelő domén

WB: Western blot

1. ELŐSZÓ

Az ioncsatornák transzmembrán fehérjék, melyeket csoportosítani lehet szelektivitás (azaz hogy milyen ionokat transzportál) és kapuzás (azaz hogy milyen stimulus aktiválja őket) alapján [1]. Gyakran vizsgált ioncsatorna család a feszültség-kapuzott kationcsatornák, melyeknek számos funkciója van. Ingerelhető sejtekben (ideg- és izomsejtek) közismert kanonikus szerepük az akciós potenciál (AP) létrehozása [2], de nem ingerelhető sejtekben is fontos működéssel bírnak. Ezek közé tartozik a nyugalmi membránpotenciál kialakítása és fenntartása, ozmoreguláció, intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és pH szabályozása, de szerepük van a sejt migrációban és proliferációban is. Így belátható, hogy a kóros működésük közvetlenül okozója lehet patológiás állapotoknak, valamint közvetett módon befolyásolhatja egyes betegségek lecsengését. Ilyen ioncsatorna betegségek (azaz „*channelopátiák*”), az epilepszia-, a Brugada-, a hosszú-QT- és a Lambert-Eaton szindrómák [3, 4]; valamint megkülönböztethetünk ioncsatornák kóros működéséhez kapcsolható patológiás állapotokat, mint daganatos, immun és autoimmun betegségeket [5, 6]. Ebből következik, hogy ezen ioncsatornák farmakológiai célpontok lehetnek számos betegség kezelésénél. Ahhoz, hogy az adott kezelés minél kevesebb mellékhatással járjon, találnunk kell szelektív gátlószereket, hogy a terápia sejt- illetve szövetspecifikus legyen. Ennek érdekében elengedhetetlen megismerni a humán sejtek ioncsatorna-profilját különös tekintettel a járulékos alegységek jelenlétére.

Dolgozatom két témát ölel fel, melynek során feltérképezi a különböző kationcsatornák kifejeződésének mintázatát fiziológias és patológiás állapotokban. A fiziológias állapotot az egészséges humán perifériás vérből nyert B sejtek jelentették. Kollaborációs projektünk a Debreceni Egyetem Transzplantációs Medicina tanszékével azt vizsgálta, hogy milyen változások következnek be a B sejtek ioncsatornaprofiljában antitest-mediált vesekilökődés során. A kutatás alatt észrevettük, hogy a kontroll (egészséges) mintákból nyert B sejtek egy részén feszültség-kapuzott nátriumcsatornákra (Na_v) jellemző befele irányuló ionáram figyelhető meg, így elvégeztük ezen áramot adó ioncsatornáknak a biofizikai- és expressziós vizsgálatát. A kóros állapot leírásához egy rosszindulatú daganatot, a glioblasztómát választottam. Ezen sejtek invazivitásához, és sugárrezisztenciájához hozzájárul a $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ ioncsatornák aktivitása [7-9]. Mivel a pórusformáló (α) alegység számos sejtben kifejeződik [10], elvégeztük a járulékos (β) alegységek expressziójának vizsgálatát, amely jó kiindulási pont az ioncsatorna szövetspecifikus gátlására.

2. BEVEZETÉS

2.1 A humán B sejtek ioncsatornái

A B sejtek vagy B limfociták az adaptív immunrendszer részét képezik, és fontos szerepük van a humorális immunválaszban antitestek termelése révén. Emellett citokin szekrécióval a T sejt differenciációt és antigén-prezentációt is befolyásolják [11-13]. Ezen komplex viselkedéshez nagyban hozzájárul a sejtmembránban kifejeződő ioncsatornák működése. A legtöbb tanulmány, ami a humán limfociták ioncsatornáiról szól, az vagy a T sejtekre fókuszált, vagy perifériás vérből vett limfocita állományt használt, amiben a B sejtek aránya csekély. Így, a humán B limfociták ioncsatorna profilja kevésbé definiált, ami utat ad számos új tanulmány elvégzésére.

A humán limfociták számos ioncsatornát kifejeznek a sejtmembránjukban (1. ábra). Ezen transzmembrán fehérjék felelősek a sejtfejlődésért, sejtproliferációért, jelátvitelért és sejtaktivációért is. Közük vannak feszültség-kapuzott-, Ca^{2+} -aktivált- és háttér káliumcsatornák; feszültség-kapuzott és raktár-függő kalciumcsatornák; feszültség-kapuzott protoncsatorna és tranziens receptorpotenciál (TRP) csatornák [14-17].

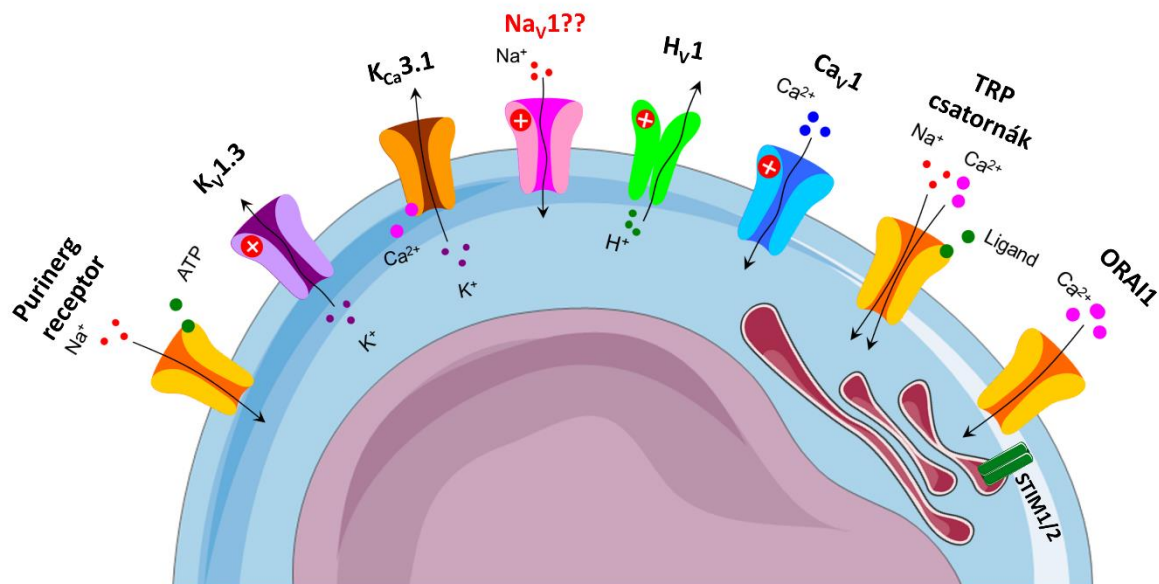
Közülük a legjobban feltérképezett ioncsatorna a feszültség-kapuzott káliumcsatorna családba tartozó $\text{K}_v1.3$, amely mind B és T sejtekben megtalálható. A csatorna a membrán depolarizációjának hatására aktiválódik, és fő feladata a membránpotenciál szabályozása. Kimutatták, hogy az izotípus váltott memória B sejtek, melyek szelekciós markerek alapján immunglobulin D (IgD; izotípus váltás markere) negatívak és CD27 (aktivációs marker) pozitívak ($\text{IgD}^-/\text{CD27}^+$), $\text{K}_v1.3$ csúcsárama szignifikánsan nagyobb, mint a naív (IgD^+ , CD27^-) és az IgD^+ korai memória B sejteké. A $\text{K}_v1.3$ specifikus gátlása Stichodactylia toxinnal, szignifikánsan lecsökkentette a sejtproliferációs készséget az izotípus-váltott (IgD^-) populációban [18].

A $\text{K}_{Ca}3.1$ egy kalcium-aktivált káliumcsatorna, mely B sejt receptor (BCR) aktiváció során, a nyugalmi membránpotenciál szabályozásával, lehetővé teszi a jelátvitelhez és sejtaktivációhoz elengedhetetlen kalcium beáramlást [19-21]. Az ioncsatorna szelektív gátlásával (TRAM-34-et alkalmazva) szignifikánsan csökkent a sejtproliferáció a naív, izotípus váltáson át nem esett (IgD^+) B sejtek esetében, melyeknél a $\text{K}_v1.3$ helyett a $\text{K}_{Ca}3.1$ ioncsatorna domináns expressziója figyelhető meg [18].

Több publikáció is született már az L-típusú kalciumcsatornák (Cav1) jelenlétéről a T és B sejt membránjában, melyek aktivációja kapcsolatban van a T és B sejt receptor (TCR és BCR) stimulációval, de jelenleg nincs elfogadott elektrofiziológiai bizonyíték a kifejeződésükről [22-26]. Egy másik kalciumcsatorna, a raktár-függő ORAI1 szintén TCR/BCR stimuláció során aktiválódik, és szerepe van a sejtproliferációban és a citokin termelésben is [27-32].

A humán limfociták nátrium permeábilis ioncsatornái nem rendelkeznek nagy irodalommal, habár pár tanulmány szerint a nátrium beáramlásnak szerepe lehet a limfociták sejtválaszában, mivel csökkentheti az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelkedésének esélyét, így megakadályozva a sejthalált [33]. Ezen csatornák között leírták az amilorid-szenzitív nátriumcsatornákat, a TRP csatornákat és a purinerg receptorokat [19, 33-36]. Korábbi áramlási citometriás és patch-clamp mérések alapján a B és T sejtek membránpotenciálja érzékeny volt az extracelluláris nátrium eltávolítására és tetrodotoxin (TTX) alkalmazásra, mindkét esetben hiperpolarizálódott a sejtmembrán. Ebből következhet, hogy feszültség-kapuzott nátriumcsatornák (Nav1) is jelen vannak a limfociták membránjában, azonban az izoformák még nem lettek részletesen meghatározva [37-39]. Jurkat T sejteken, melyek a leukémia modellezéséhez használt limfoblasztok, TTX rezisztens Nav1.5-öt írtak le, melynek működése elősegíti a sejt migrációt [40]. Emellett CD4 pozitív T sejteken is leírták a Nav1.5 jelenlétét, ahol a pozitív szelekcióban van meghatározó szerepe [41].

Az utóbbi évtizedekben sok publikáció született a limfociták ioncsatornáiról, és van bizonyíték a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák jelenlétéről a limfociták membránjában, de eddig nem készült olyan tanulmány, ami elektrofiziológiai és molekuláris biológiai módszerekkel is vizsgálja, és részletesebben karakterizálja a Nav1 ioncsatornákat a humán B sejteken.



1. ábra: A humán B limfocita membránjában kifejeződő ioncsatornák.

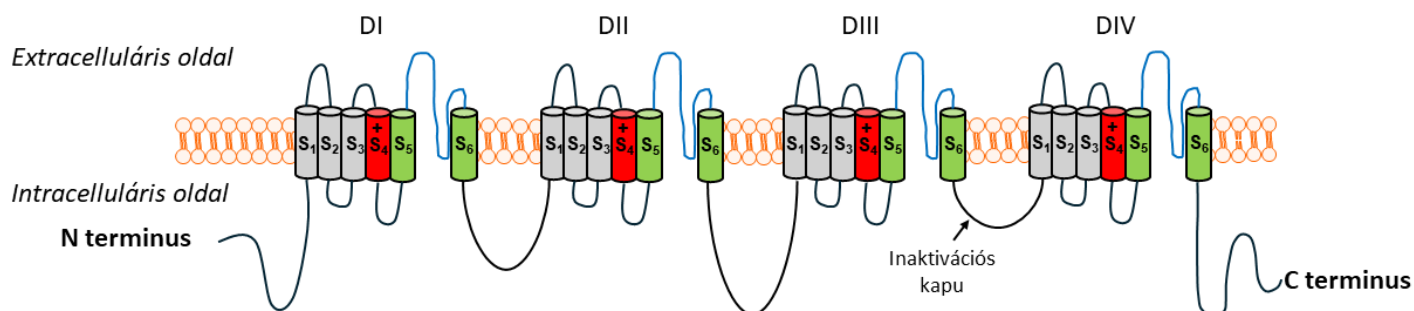
Feszültség-kapuzott ioncsatornák közül megfigyelhető a $K_V1.3$, H_V1 , Ca_V1 és a Na_V1 csatornák jelenléte. Kalcium-függő ioncsatornák ($K_{Ca3.1}$, $ORAI1$ és TRP) mellett leírták a nátrium permeábilis purinerg receptorok expresszióját is.

2.2 A feszültség-kapuzott nátriumcsatorna család (szerkezet és funkció)

A feszültség-kapuzott nátriumcsatornák (Nav1) legismertebb funkciója az akciós potenciál kialakítása az ingerelhető sejtek membránjának depolarizációján keresztül. A Nav1 ioncsatorna család 9 tagból áll (Nav1.1-1.9), melyeket az SCN1A-5A (Nav1.1-1.5) illetve az SCN8A-11A (Nav1.6-1.9) gének kódolnak [42, 43]. Közülük a Nav1.1, 1.2, 1.3 és 1.6 főleg a központi idegrendszerben található meg, míg a Nav1.7-1.9 csatornák a perifériás idegrendszerben fejeződnek ki. Az idegsejtek mellett, az ingerelhető sejtek másik csoportjában, az izomsejtekben is kifejeződnek Nav1 csatornák. A Nav1.4 a vázizomban, míg a szívizomban a Nav1.5 dominál [44]. Amellett, hogy a fő funkciójuk az AP kiváltása, a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák megtalálhatóak a nem ingerelhető sejtek membránjában is, mint asztrociták [45-48], hasnyálmirigy béta sejtek [49], keratinociták [50], dendritikus sejtek [51], makrofágok [52, 53], vörösvértestek [54], T sejtek és neutrofil granulociták [40, 55]. Ezekben a sejtekben a nyugalmi membránpotenciál kialakításán túl szerepük van a sejtmigrációban és -differenciációban, és expressziós szintjük gyakran változik a differenciáció során [56-59].

A szerkezetükben hasonlóak, miszerint négy doménből álló, körülbelül 230 kDa méretű polipeptid lánc alkotja ezen ioncsatornák alfa, pórusformáló alegységét (2. ábra) [60]. Mind a négy domén (DI-DIV) hat transzmembrán hélixből, és az azokat összekötő intra- és extracelluláris hurkokból áll. A transzmembrán hélixeket S1-S6 jelzéssel látták el. Az S1-S4-ig tartó régió adja a feszültség szenzort (Voltage-Sensing Domain = VSD), melyből az S4 hélix rendelkezik pozitívan töltött aminosavakkal (arginin vagy lizin minden harmadik helyen), ami emiatt membrán-depolarizáció hatására elmozdul az extracelluláris tér felé [61]. A feszültségszenzor S4 hélice összeköttetésben (S4-S5 hurok) áll a pórusal (Pore Domain = PD), amit az S5-S6 hélixek és az azokat összekötő extracelluláris hurok (P-hurok) alkot. Így az S4 elmozdulásával, az S4-S5 hurkon keresztül, konformációváltozás következik be, amelynek eredményeképpen nyit az ioncsatorna pórusa. Membrán-depolarizáció alatt, a csatorna nyitáson kívül, bekövetkezik az inaktiváció, melynek során az inaktivációs kapu (DIII S6 hélix és DIV S1 hélix közti intracelluláris hurok) lefedi a csatorna pórusát. Membrán-repolarizáció során az S4 hélix nyugalmi pozícióba kerül és elérhető lesz aktivációra egy újabb depolarizáló stimulus során [62]. Az ioncsatorna pórusát formáló S5-S6 hélixek adják a szelektivitási szűrőt is, melynek aszimmetriájához a négy domén négy különböző aminosavval járul hozzá (aszpartát a DI, glutamát a DII, lizin a DIII és alanin a DIV részéről). Az aminosavak betűkódjából eredeztetve ennek a belső gyűrűnek a neve a DEKA

gyűrű, mely az ioncsatorna pórusának legszűkebb része, ahol a nátrium ionok hidrát burokkal együtt haladnak át [63]. A pórusban megtalálható még az aktivációs kapu is, amit az S6 hélixek négy-négy hidrofób aminosava képez az intracelluláris oldalon.



2. ábra: A feszültség-kapuzott nátriumcsatornák általános szerkezete.

A Nav1 ioncsatornák négy doménből (DI-DIV) álló S1-S3 (szürke) hélixek a pozitív töltéssel rendelkező S4 (piros) hélix-szel alkotják a VSD-t. A zöld jelzéssel ellátott S5-S6 hélixek az ioncsatorna pórusát alkotják az extracelluláris P-hurokkal (kék). Az intracelluláris oldalon található az inaktivációs kapu a DIII és DIV között.

A Nav1 csatornákat elkülöníthetjük biofizikai paraméterek és farmakológia alapján. A biofizikai paraméterek között vizsgálhatjuk az aktiváció és inaktiváció kinetikáját, ezeknek a feszültség-függését és az inaktivációból való visszatérés kinetikáját is. Az aktivációs időállandó (τ) az alkalmazott feszültségtől függően 0,1 és 1 ms között változik, míg az inaktivációs időállandó 1-2 ms körüli tartományban van a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák körében [64]. (Kivételt képez a Nav1.9 melynek lassú inaktivációja perzisztens áramot okoz, hozzájárulva az AP kialakulásához érző idegsejtekben [65].) Mivel ezen kinetikák nagyon hasonlóak az egyes izoformákban, valamint a csatorna faji eredete és az expressziós rendszer is befolyásolja az értékeit, ezek a paraméterek nem segítenek sokat egy adott Nav1 csatorna izoformájának meghatározásában. Az aktiváció- és inaktiváció feszültségfüggését a V_{50} értékkel tudjuk jellemezni, mely az a transzmembrán-potenciál, ahol a csatornák nyitási valószínűsége (p_o) 50%. A V_{50} érték irodalmi adatok alapján nagyon szór. A Nav1.5 csatornát vizsgálva heterológ

expressziós rendszerben az aktivációs V_{50} érték -25 mV és -51 mV között, míg az inaktivációs V_{50} érték -60 mV és -103 mV között került publikálásra [66-70]. Emiatt a V_{50} értékek sem szolgálnak megbízható információval a Nav1 csatornák elkülönítésében. A legnagyobb különbséget az inaktivációból való visszatérés kinetikájában mutatják a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák. Ezen paraméter alapján megkülönböztethetünk gyorsan (például Nav1.3 és 1.6) és lassan (például Nav1.7 és 1.9) visszatérő Nav1 csatornákat [65, 71, 72].

Biofizikai tulajdonságaik mellett, jellemezhetjük a Nav1 csatornákat farmakológia modulátoraik alapján is. Az egyik leggyakrabban használt Nav1 gátlószer a tetrodotoxin (TTX), egy gömbhalsból izolált cukorvázú neurotoxin, mely a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák pórusához reverzibilisen kötődik az extracelluláris oldalról (2. ábra, kék színnel jelölt hurkok). TTX szenzitivitás alapján az izoformák között megkülönböztethetünk arra nM-os koncentrációban érzékeny szenzitív (Nav1.1-1.4, 1.6 és 1.7), és arra μ M-os koncentrációban érzékeny rezisztens (Nav1.5, 1.8 és 1.9) típusokat [73]. A TTX bomlásterméke, a 4,9-anhidroTTX, $\sim$ 100-szoros szelektivitással rendelkezik Nav1.6 csatornára nézve a többi, TTX szenzitív csatornával szemben [74]. A TTX-on kívül számos toxin van (saxitoxin, brevetoxin, batrachotoxin stb.), melyek általános Nav1 modulátorként működnek. Szelektív Nav1 gátlók között vannak a kúpcsigákból izolált GIIIA és GIIIC μ -conotoxinok, melyek a vázizom-specifikus Nav1.4 szelektív gátlószerei [75]. Ezeken kívül gyakran használják Nav1.7 szelektív gátlására egy tarantulából izolált peptid inhibitort, a protoxin-II-t [76]. Szelektív Nav1 gátlók kifejlesztése nemcsak az izoformák *in vitro* elkülönítéséhez szükséges, hanem a Nav1 ioncsatornákkal kapcsolatos betegségek kezeléséhez potenciális gyógyszerjelölt molekulákat eredményez.

2.3 A glioblasztóma és az U-87 sejtvonal

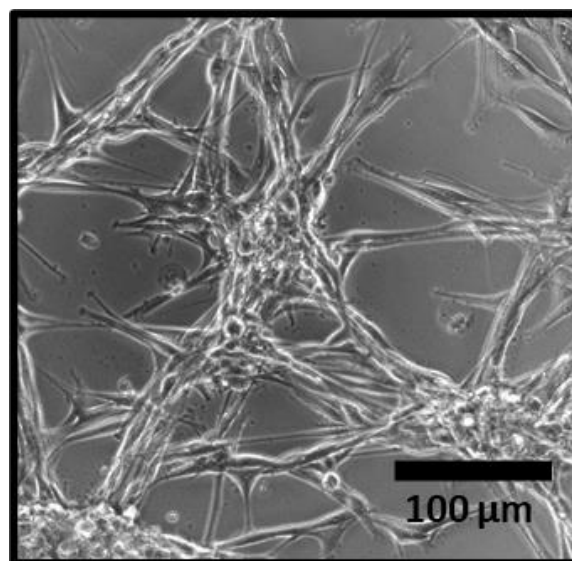
A daganatok környezetüktől függetlenül, autonóm módon növekedő sejt/szövetszaporulatok. Mint minden szervrendszerben, a központi idegrendszerben is előfordulhat neoplázia, de ezen daganatok eltérnek a más szövetekben megjelenő neoplasztikus folyamatoktól, mivel nincsen pre malignus vagy *in situ* formájuk; alacsony malignitású formájuk is infiltratív, súlyos klinikai tüneteket okozva; és nagyon ritkán adnak metasztázist [77].

A gliomák az agyállomány gliasejtjeiből eredeztethető tumorerő, melyeknek több csoportja is ismert. Ilyenek az oligodendrogliómák,ependimómák és az asztrocitómák. A glioblasztóma az utóbbiak közé tartozó malignus, legkevésbé differenciált (IV. grádusú) diffúz asztrocitóma, melynek kialakulásában számos jelátviteli útvonalat érintő génnek a mutációja fedezhető fel, mint a p53 és Rb tumorszuppresszor gén funkcióvesztő, valamint a foszfoinozitol-3-kináz funkcióerő mutációja [78].

Klinikai kutatásokban gyakran, az emberi szövetminták helyett, sejtvonalakat használnak. Ennek oka lehet a kollaborációs partner hiánya, a kutatásba bevehető betegek limitált száma, valamint az etikai engedély megszerzése. A sejtvonalaknak előnyei és hátrányai is vannak a szövetmintákkal szemben. Előnyök közé tartozik a könnyű fenntarthatóságuk, hátrányuk közé pedig a homogenitásuk és a szaporításuk okozta *de novo* mutációk kialakulása. A glioblasztóma kutatásban leggyakrabban használt sejtvonal az U-87 MG, mely az Uppsala-87 Malignant Glioma rövidítése. A sejtvonal alapjául használt szöveti mintát 1966-ban vették egy 44 éves férfi páciens-től. Az U-87 MG sejtekre jellemző az epitél morfológia (3. ábra), valamint a diploidhoz közel álló hipodiploid genotípus. Több mint 50 év alatt valószínűsíthető, hogy bekövetkeztek az előbb említett genetikai mutációk a sejtvonalon, de arról nem található irodalmi adat, hogy az U-87 MG sejtek és a glioblasztóma között van-e invazivitásbeli különbség [79].

A multiform glioblasztóma (glioblastoma multiforme = GBM) jelentős életminőség vesztéssel járó daganatos betegség. Prognózisa rendkívül kedvezőtlen, mivel az átlagos túlélési idő a legjobb kezelések ellenére sem haladja meg a 15 hónapot [80]. A klinikumban a klasszikus kemoterápiás szereket (temozolomid, ciszplatin, karmusztin) kombinálják sugárterápiával és műtéttel. Ezen kezelések elsőszerű célja és eredménye a „debulking” azaz a daganat térfogatának a csökkentése, így definitív, a daganat megszüntetésére irányuló terápiás kombinációra ugyan vannak kezdeti kutatások, de még mindig limitált eredményekkel kecsegtetnek [81]. Így szükség van új terápiás szerekre, melyek hatékonyan fellépnek azon klinikai kihívásokkal szemben, melyeket a GBM kezelése okoz.

Egy új terápiás célpont lehet a GBM invazivitásához hozzájáruló $K_{Ca}1.1$ (más néven BK, Slo1 vagy MaxiK) ioncsatorna, mely külön splice variánssal (gBK azaz glióma BK), dominánsan kifejeződik ezen daganatos sejtek membránjában [82, 83].

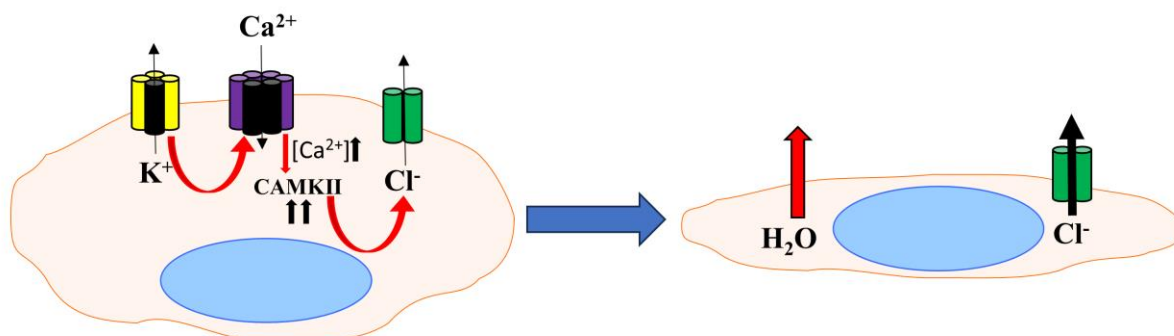


3. ábra: Az U-87 MG sejtek fénymikroszkópos képe.

Megfigyelhető a nyúlványok megjelenése és a fészkes elrendeződés a letapadt, konfluensen benőtt sejt kultúrában.

2.4 A $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna szerepe a glioblasztóma inváziójában

A GBM invazivitását már több ioncsatorna fokozott működésével is kapcsolatba hozták. Ezek között van a $Nav1.7$, a feszültség-kapuzott kloridcsatornák családjába tartozó $ClC-3$ (ami H^+/Cl^- antiporterként is képes működni), és a $K_{Ca1.1}$ [7, 84, 85]. Az utóbbi kettőnél egy közös elmélet van az invazivitás kialakulásának mechanizmusában, melynek alapja a sejtterefogat csökkenése. A celluláris ozmoregulációs modell alapján a vízvesztés ionáramhoz társul, így kifele irányuló kálium- és kloridáramhoz (4. ábra) [8]. Az előbbi nagy részét a $K_{Ca1.1}$, míg utóbbit a $ClC-3$ adja. A hipotézis alapján a $K_{Ca1.1}$ káliumáramához paralel társul az intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedése a kalciumraktár-függő csatornák (ORAI) működése által, így a kalcium/kalmodulin dependens protein kináz II (CAMKII) aktív lesz [86], ami citoszekeletális változásokat okoz, ez pedig a feszülés-függése miatt aktiválja a $ClC-3$ transzportert. Ezen kívül a CAMKII a $ClC-3$ -at is foszforilálja, így közvetlenül is aktiválja a kloridáramot [87].



4. ábra: A glioblasztóma ozmoregulációs modellje.

A $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna aktivitása a Ca^{2+} /kalmodulin/CAMKII útvonalon keresztül fokozza a klorid transzportot, ami vízvesztéssel társul.

A $K_{Ca1.1}$ -nek, valószínűsíthetően az előbb említett modell miatt, a GBM sugárterápiás rezisztenciájához is köze van. Stenlie és munkatársai 2 Gy röntgensugárzást alkalmazva vizsgálták a glioblasztóma migrációját. Eredményeik alapján a 2 Gy sugárzást kapó sejtek migrációs készsége megnőtt a kontroll csoporthoz képest, azonban ezt a készséget szignifikánsan csökkentette a $K_{Ca1.1}$ csatorna szelektív gátlószerének, a paxilline-nak (Pax) egyidejű alkalmazása [9].

Az irodalomban arra is található utalás, hogy a $K_{Ca1.1}$ gátlásával növelni lehetne a GBM kemoszenzitivitását. Hipoxiás környezetben, ami növeli a $K_{Ca1.1}$ expressziót, az U-87 MG sejtek migrációs készsége nőtt, valamint szenzitivitása csökkent ciszplatinra. Ezt 2 μ M Pax tenyésztőmediumhoz való adása megszüntette [88]. A kemo- és radioszenzitivitásban játszott szerepe miatt ez az ioncsatorna tökéletes célpont lehetne adjuváns kemoterápiás kezeléshez.

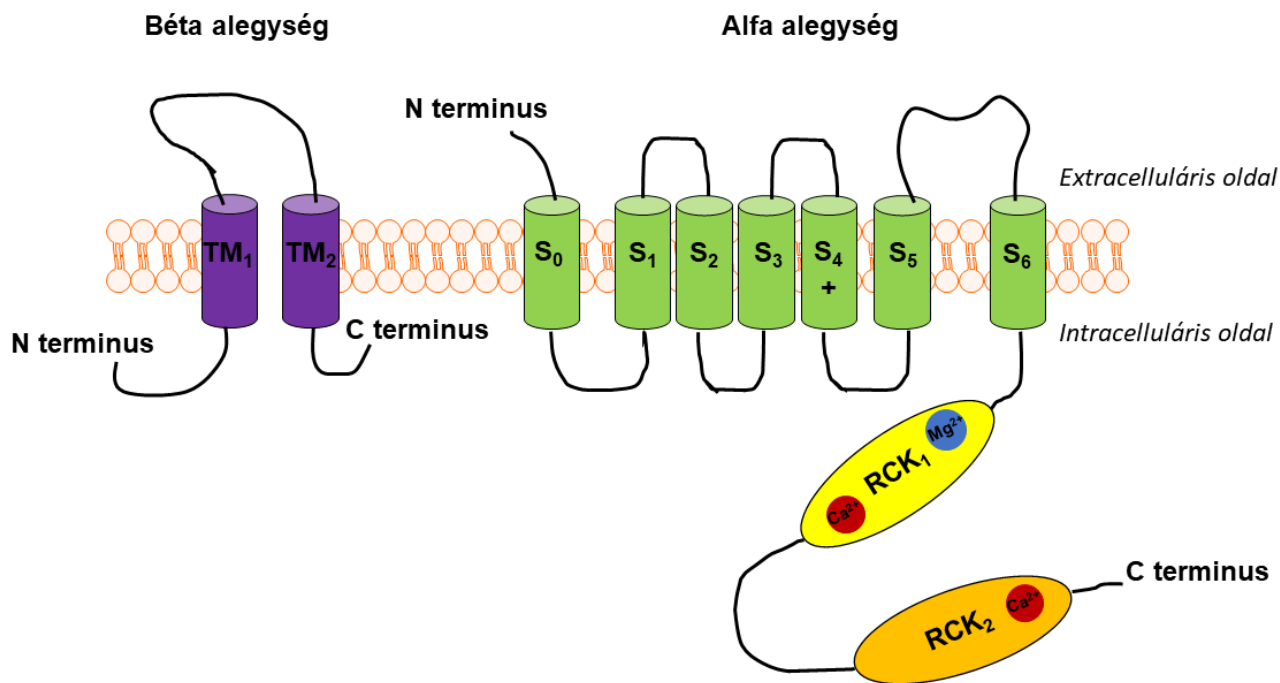
2.5 A K_{Ca}1.1 ioncsatorna szerkezete és funkciója

A K_{Ca}1.1 ioncsatorna egyesített nomenklatúrában használt nevén kívül BK, MaxiK és Slo1 néven is ismert. Az előbbi kettő a magas K⁺ vezetőképességre utal, mely irodalom alapján 200-300 pS körüli tartományban mozog [89-91]. Az utóbbi pedig a *Drosophila* slowpoke-hoz való hasonlóságot jelzi, mely a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) magas konduktanciájú, feszültség- és intracelluláris kalcium- kapuzott, homotetramer szerkezetű káliumcsatornája [92].

A K_{Ca}1.1, a többi K_{Ca} ioncsatornával ellentétben, kalcium-függésén kívül feszültség-kapuzott is; valamint leírták már a csatorna feszülés általi aktiválódását is [93]. Mint a legtöbb feszültség-kapuzott ioncsatorna, a K_{Ca}1.1 is tetramer, azaz négy alfa alegység képezi a funkcionális csatornát. Ezen alfa monomerek a KCNMA1 gén termékei. Hasonlóan az előbb már említett Nav ioncsatornákhöz, egy alfa alegység egy VSD-ből és egy PD-ből áll. A K_{Ca}1.1 azonban eltéréseket mutat a klasszikus feszültség-kapuzott ioncsatornák szerkezetéhez képest (5. ábra) [94]. Ilyen a VSD-ben az S0 hélix, ami a feszültség-érzékelésen kívül, a kalcium érzékenységhez, és a béta alegység moduláció létrejöttéhez szükséges [95, 96]. A C terminális oldalon található a citoszolikus RCK1 és RCK2 domének, melyeken található 1-1 kalciumion kötőhely [97]. Továbbá az RCK1 tartalmaz egy magnézium ion kötőhelyet is [98, 99]. Érdekesség továbbá a K_{Ca}1.1 szerkezetében, hogy a VSD S4 hélixének csak egy töltött aminosava, a 213. pozícióban lévő arginin, járul hozzá bizonyítottan a feszültség érzékeléséhez [100].

Ezen ioncsatorna számos emlős sejtben/szövetben kifejeződik, melyekben eltérő biofizikai, illetve farmakológiai tulajdonságokat mutat. Ennek a változatos viselkedésnek a hátterében a moduláló járulékos alegységek állnak. Jelenleg két típusát ismerjük a szabályozó alegységeknek: a béta- (β) és a gamma (γ) alegységeket. Az előbbieknél négy altípusát különböztethetjük meg (β 1- β 4), melyek a KCNMB1-4 gének termékei, és az α alegységekkel 1:1 arányban tudnak asszociálódni [101]. Szerkezetük hasonló, mivel kis fehérjék (méretük 20-30 kDa között van) [102], melyek két transzmembrán hélixből (TM1 és TM2) és azokat összekötő nagy extracelluláris hurokból állnak (5. ábra) [103]. A béta alegységek komplexet képeznek a pórusképző alfa alegységekkel. A TM1 az S1 és S2, míg a TM2 az S0 hélix-el van helikális kontaktusban, valamint a béta alegységek extracelluláris hurkai az ioncsatorna pórusának szájadékának közelében találhatóak [96]. Ezen extracelluláris hurkok számos ciszteinnel rendelkeznek, melyek között diszulfidhidak alakulnak ki, befolyásolva az ionáramlást, miszerint a β 2 és 3 kifejeződése

farokáram egyenirányítást okoz (azaz negatívabb membránpotenciál értékeken eltűnik, míg pozitívabbakon megjelenik az ioncsatorna zárását jól karakterizáló farokáram) [104].



5. ábra: A $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna szerkezete.

Az alfa alegység (bal oldal) eltér a többi feszültség-kapuzott ioncsatornáétól, mivel hét transzmembrán hélix alkotja és az intracelluláris oldalon rendelkezik Ca^{2+} és Mg^{2+} kötőhelyet adó RCK doménekkel. Az alfa alegységekhez társulhatnak moduláló béta alegységek is (jobb oldal).

A béta alegységek a $K_{Ca1.1}$ csatorna biofizikai paramétereit a következőképpen befolyásolják: A $\beta 1$, mely többek között a simaizomban és vesében fejeződik ki [105, 106], növeli a csatorna kalcium érzékenységét, így 10 μM intracelluláris szabad Ca^{2+} esetében az aktivációs V_{50} érték negatívabb tartományba tolódik (kb. -50 mV-tal) [107]. A $\beta 2$, mely a hasnyálmirigyben, lépben, vesében és petefészekben fejeződik ki, a $\beta 1$ -hez hasonlóan negatív tartományba viszi a csatornaaktiváció feszültségfüggését [108]. Ezen kívül a $\beta 2$ az N terminális oldalon inaktivációs labdával rendelkezik, mely felelős a csatorna gyors (20-30 ms időállandó) és komplett inaktivációjáért, mely alacsony $[Ca^{2+}]_i$ során is bekövetkezik [109, 110]. A $\beta 3$ négy splice variánssal rendelkezik ($\beta 3a-d$), melyek leginkább a lépben, hasnyálmirigyben és herékben

fejeződnek ki [111]. A $\beta 3$ alegységek a csatorna aktivációját nem befolyásolják, azonban, ha $\beta 3a$ -c alegység társul a $K_{Ca1.1}$ -hez, akkor az ioncsatorna nagyon gyors (~ 1 ms időállandóval), de inkomplett inaktiváción megy keresztül pozitívabb tesztpotenciálokra ($+100$ mV felett), amennyiben magas (legalább $10 \mu M$) az intracelluláris szabad Ca^{2+} szint [112]. Végül, ha az agyban dominánsan kifejeződő $\beta 4$ asszociálódik az alfa alegységhez, akkor a csatorna feszültségérzékenysége csökken, és az aktivációs V_{50} érték pozitívabb membránpotenciál értékekre tolódik [103].

A gamma alegységek ($\gamma 1$ - $\gamma 4$) ~ 35 kDa nagyságú transzmembrán fehérjék, melyeket az LRRC26, -52, -55 és -38 gének kódolnak [113]. A szerkezetük hasonló, mivel egy transzmembrán doménből (TM), az N terminális részen egy extracelluláris leucinban gazdag doménből (LRRD) és egy rövid intracelluláris C terminális farki részből állnak. Ezeket az alegységeket először prosztatarák (LNCaP) sejtekben fedezték fel, és azóta megtalálták nyálmirigyekben, pajzsmirigyben, csecsemőmirigyben, herében és az agyban is [90, 114]. Az LRRC26 ($\gamma 1$) expressziója heterológ expressziós rendszerben, HEK-293 sejteket alkalmazva, 120 - 140 mV-tal tolta a csatorna konduktancia-feszültség függését (G-V görbe) a negatív, hiperpolarizáló feszültségtartományba [114]. A γ alegységek kifejeződése még szabad intracelluláris Ca^{2+} hiányában is elősegíti a $K_{Ca1.1}$ aktivációját nullától negatívabb membránpotenciálokra. Így a γ alegységek $K_{Ca1.1}$ -hez való társulása nagyban megváltoztatja a csatorna feszültségérzékelését, egy teljesen új ioncsatorna fenotípust létrehozva.

A $K_{Ca1.1}$ számos élettani funkcióban játszik szerepet [115]. A simaizomban az aktivációja a sejtmembrán hiperpolarizációja, így a Ca_v1 ioncsatornák gátlása révén simaizom relaxációt okoz, ami az erekben vazodilatációként, a húgyúti rendszerben pedig a kontrakciók negatív visszacsatolásaként jelenik meg [116]. Így a $K_{Ca1.1}$ diszfunkciója hipertóniához, inkontinenciához és hiperaktív hólyaghoz vezet [117, 118]. A $K_{Ca1.1}$ a vese kortikális gyűjtőcsatornájának fő- és interkaláris sejtjeinek apikális membránjában is kifejeződik, ahol a K^+ háztartásban működik közre [119]. Az idegrendszerben a preszinaptikus membránban kifejeződve, negatív modulátorként szabályozza a neurotranszmitterek szekrécióját, valamint a neuronális AP kialakulását és tüzelési frekvenciáját [120, 121]. A $K_{Ca1.1}$ kóros működését leírták epilepsziákban, szkizofréniában és autizmusban is [122].

2.6 A $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna modulátorai

A $K_{Ca1.1}$ számos modulátorral rendelkezik. Ezek között vannak olyan szerek, melyek csak az alfa alegységeken keresztül hatnak, illetve olyanok, melyek a járulékos β alegységeken keresztül befolyásolják a csatorna működését [123, 124]. Az előbbiekhöz tartozik az általános K_v gátlószer, a tetraetil-ammónium (TEA), és a paxilline (Pax), melyek millimólos, illetve nanomólos koncentrációban gátolják az ioncsatornát. Az utóbbiak között számos farmakon van, ideértve skorpiótoxinokat (iberiotoxin, charybdotoxin, slotoxin stb.), a zsírsavakat (arachidonsav, dokozahexaénsav, eikozapentaénsav stb.), szterán-vázis vegyületeket (17 β -ösztradiol, tamoxifen, litokólsav stb.) és az etanolt is. A következőkben azoknak a szereknek fogom részletesen ismertetni a hatásmechanizmusát, melyeket a kísérleteimben is használtam.

Litokólsav (LCA): Az epesavak közé tartozik, és fő feladata a zsírok szolubilizációja. Emellett aktiválja az epesav-szenzitív ioncsatornákat (BASIC) [125], és a $K_{Ca1.1}$ -et is β alegység-függő módon [126]. Az LCA káliumáram növelő hatását *Xenopus laevis* expressziós rendszerben vizsgálták makropatch (inside-out) technikával. Az eredmények alapján az LCA még 150 μ M-ban sem növelte szignifikánsan a csatorna nyitási valószínűségét, ha csak a pórusképző alfa alegységet injektáltak. Azonban $\beta 1$ alegységet is kifejező oocitáknál az LCA már kisebb koncentrációban is szignifikánsan emelte az áramamplitúdót. Az LCA okozta káliumáram növekedés feszültség- és $[Ca^{2+}]_i$ független volt. Ezen kívül vizsgálták az LCA okozta vazodilatációt kontroll és $\beta 1$ knockout egereknél, miszerint 45 μ M LCA értágulatot okozott a vad típusnál, míg a knockout populációnál nem volt értágító hatása. A $\beta 1$ LCA szenzorának felderítéséhez $\beta 1/\beta 4$ kimérákat használtak, és azt találták, hogy ha csak a TM2 részt adja a $\beta 1$ alegység a kimérában, akkor is megmarad az LCA szenzitivitás, azonban a TM1 vagy az extracelluláris hurok nem játszik szerepet az LCA érzékelésben [127].

Arachidonsav (AA): Többszörösen telítetlen, $\omega 6$ családba tartozó zsírsav, melynek fontos jelátviteli szerepe van gyulladásos folyamatokban, mint másodlagos hírvivő [128]. Ezen kívül számos ioncsatornára hat, így gátolja az Na_v csatornákat, aktiválja a H_v1 és TRP csatornákat [129-131]. A $K_{Ca1.1}$ -re kifejtett hatása β alegység-függő: az AA alkalmazása lassítja a csatorna $\beta 2$ vagy $\beta 3$ alegységek által kiváltott inaktivációját és növeli a csúcsáramot [132]. A hatásmechanizmus vizsgálatához először tripszinnel emésztették a $\beta 2$ N-terminális részét. Az AA alkalmazása erre a tripszin-emésztett alegységre nem váltott ki áramnövelő hatást, így arra következtettek, hogy az AA az N-terminális részen keresztül fejt ki a hatását. További kísérletekben azt vizsgálták, hogy

az AA a $\beta 2$ inaktivációs labdáján keresztül fejt-e ki az inaktivációt lassító hatását, megakadályozva az inaktivációs labdának a csatorna pórusához való kötődését. Ehhez a $\beta 2$ alegység első 26 aminosav részét előállították szintetikusán, és intracellulárisan alkalmazták, mely már 1 μM -os koncentrációban is előidézi a csatorna inaktivációját. Azonban AA és a szintetikus labda együttes alkalmazása nem érte el a várt hatást, azaz nem növelte meg az áramamplitúdót és nem lassította a csatorna inaktivációt sem. Ebből következtethetünk, hogy az AA nem direkt kötődik az inaktivációs labdához, hanem a $\beta 2$ konformáció-változásán keresztül akadályozza meg az N-típusú inaktiváció bekövetkezését.

Egy másik kísérletsorozatban az AA hatását vizsgálták simaizom-sejteken, melynek során azt tapasztalták, hogy 10 μM intracellulárisan alkalmazott AA szignifikánsan megemelte a BK csatorna nyitás valószínűségét [133]. Mivel irodalmi adatok alapján ismert a $\beta 1$ alegység kifejeződése a vaszkuláris simaizom-sejteken, ezért heterológ expressziós rendszerben is vizsgálták az AA hatását. 10 μM AA szignifikánsan megemelte a csúcsáramát a $\alpha/\beta 1$ komplexet kifejező HEK sejteknek a csak α alegységet kifejező sejtekhez képest. Ezt a feszültségszenzor módosításán keresztül éri el az AA, mivel alkalmazása szignifikánsan negatívabb feszültségtartományba tolta az aktivációs V_{50} értéket.

Iberiotoxin (IbTx): A kelet-indiai vörös skorpió mérgéből izolált 37 aminosavból álló peptid, mely nM-os koncentrációban szelektíven és reverzibilisen gátolja a $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ csatornát, az ioncsatorna pórusának extracelluláris oldalához kötődve [134]. Az IbTx gátlásának van β alegység függése is, miszerint az $\alpha/\beta 4$ csatorna-komplexet még mikromólos koncentrációban sem gátolja, ha pedig $\beta 1$ társul az α alegységhez, akkor a disszociációs konstans (K_d) a $\sim\text{nM}$ -os tartományból a 0.1 μM -1 μM -os tartományba tolódik [135]. Az IbTx rezisztencia mögött a β alegységek extracelluláris hurka áll, mely a csatorna szerkezete alapján a pórus extracelluláris szájadékához közel helyezkedik el. Ennek a szájadéknak negatív töltéssel rendelkező részével az IbTx, a nettó pozitív töltése miatt, elektrosztatikus kölcsönhatásba kerül. A $\beta 1$ és $\beta 4$ alegységek extracelluláris hurkai azonban több bázikus aminosavval is rendelkeznek, melyek pozitív töltésű elektrosztatikus taszító pajzsot alkotnak a toxinkötődést megakadályozva [136].

Paxilline (Pax): *Penicillium paxilli* nevű gomba termelte toxikus indol alkaloid, mely szelektíven és reverzibilisen gátolja a $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ -et már nanomólos koncentrációban is ($K_d \sim 10\text{-}50\text{ nM}$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ függően). A Pax nagyobb affinitással kötődik a csatorna zárt állapotához, így a csatornablokk fordítottan arányos a P_O -val ($K_d = 10\text{ nM}$, ha $P_O \approx 0$; $K_d = 10\text{ }\mu\text{M}$, ha $P_O \approx 1$). Mivel a

csatorna gátlása paxilline-nel nem módosította szignifikánsan az aktivációs V_{50} értéket, és nem akadályozta meg a metántioszulfonát ioncsatorna pórushoz férését, így feltételezik, hogy a Pax a csatorna extracelluláris oldalán a pórushoz kötődik felszínesen („*lid block*”), stabilizálva a zárt állapotot, a klasszikus csatorna okklúzió („*plug block*”) helyett [137].

Ditiotreitol (DTT): Biokémiai reakciókban használt redukálószer, mely a diszulfid kötések bontja. $\beta 2$ vagy $\beta 3$ kifejeződése során a farokáram kifelé irányuló egyenirányításért felelős, extracelluláris hurkok között kialakult, diszulfidhidakat bontja, mellyel megszünteti az egyenirányítást. Így mM-os koncentrációban extracellulárisan alkalmazva a DTT prominens befelé irányuló farokáramot okoz negatív membránpotenciálok [104].

A kísérletsorozatunkban alkalmazott modulálószer közül a Pax és az IbTx szelektív $K_{Ca1.1}$ csatornára, míg az AA és az LCA más ioncsatornákon keresztül is kifejtheti hatását.

3. CÉLKITÚZÉS

Doktori értekezésem két különálló tanulmányon alapszik, ahol különböző feszültségkapuzott kationcsatornák expresszióját vizsgáltam fiziológiás és patológias környezetben.

- 1.) Az első cikkben célunk volt annak felderítése, hogy a B sejtek kifejeznek-e Nav csatornákat fiziológiás állapotban, és ha igen, akkor meghatározni azok izoformáit, biofizikai paramétereit, és információt nyerni a lehetséges funkcióikról. A Nav csatornák expressziójának vizsgálatát molekuláris biológiai módszerekkel, részletes biofizikai karakterizálását patch-clamp technikával terveztük megvalósítani.
- 2.) A fentebb említett patológias környezetet a glioblasztóma sejtek jelentették. A REMBRANDT („REpository of Molecular BRAin Neoplasia DaTa”) adatbázis alapján a KCNMA1 gén a GBM-es betegek csak ~10%-ában túlexpresszált, és a csatorna túlzott kifejeződése nem korrelál a betegek túlélési idejével. Ugyanitt a KCNMB3 gén expresszója mRNS szinten fokozott a magasabb grádusú és rosszabb prognózisú gliómáknál. Azonban arra nincs adat, hogy milyen β alegységek fejeződnek ki funkcionálisan, és alkotnak komplexet a $K_{Ca1.1}$ ioncsatornával a GBM membránjában. Ezért célunk volt meghatározni az invazivitáshoz és sugárrezisztenciához hozzájáruló $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna fenotípusát primer GBM sejteket és glioblasztóma sejtvonalat használva.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

Az összes fogyóanyagot a Sigma-Aldrichtól (St. Louis, MO, USA) vásároltuk, hacsak más forrás nincs megjelölve.

4.2 Sejtek izolálása

4.2.1 Primer glioblasztóma (GBM) sejtek

A betegekből nyert GBM szövetmintákkal való kísérletezést az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB, IV/186-1/2022/EKU) engedélyezte. A diagnózist neuropatológus állapította meg WHO kritériumok alapján. Minden betegről írásos beleegyezést kaptunk. A tumormintákat sebészeti eltávolítása után HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) oldatba raktuk, és jégen tároltuk a szállítás ideje alatt. A szövetmintákat 1-es típusú kollagenázzal emésztettük 30 percen keresztül. Ezután homogenizáltuk 15 ml-es Dounce homogenizátorral majd Pasteur pipettákkal. Ezt a sejtsuszpenziót majd 70 μ M átmérőjű sejtszűrőn (Corning®, Corning, NY, USA) folyattuk át, majd T75-ös sejtenyésző flaskában tapasztottuk le 2 órán keresztül 10%-os FBS (főtalás borjúsavó) tartalmú DMEM médiumot használva (37 °C és 5% CO₂) majd kétszer mostuk 1x-es PBS-ben (foszfátpuffer), mielőtt újra felvettük őket a sejtmédiumban. (A sejtek tisztaságát gliális fibrilláris acidikus protein jelölésével igazoltuk, és csak azokon a sejteken kísérleteztünk, melyek 90% feletti pozitivitást mutattak.)

4.2.2 Humán perifériás B sejtek

Minden nap, az elektrofiziológiai mérések előtt, reggel történt a perifériás vénás vérvétel, melyhez egészséges felnőtt donorokat (nincs krónikus betegség vagy gyógyszeresedés, N=8) választottunk. Naponta donoronként 25-30 ml vér került levételre, melyet nátrium-heparinos csövekben gyűjtöttünk össze. Ezek a donorok a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársai voltak.

Elsőnek a teljes vért kétszeresére hígítottuk HBSS-ben, majd a mononukleáris sejteket denzitásuk alapján szeparáltuk, melyhez Histopaque-1077 szeparáló oldatot és SepMate™

(STEMCELL™ Technologies, Vancouver, Kanada) szeparáló csöveket alkalmaztunk. Ezután a B limfocitákat a mononukleáris sejtek közül mágneses gyöngyös szeparálással izoláltuk (human Pan B cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) a gyártó által mellékelt leírás alapján. A sejtszámot meghatároztuk Bürker-kamra segítségével, majd reszuszpendáltuk a pelletet $40 \mu\text{l}/10^7$ sejt gáztalanított pufferben (PBS, 0.5% albumin és 2 mM EDTA). Ezután hozzáadtuk a biotin-konjugált antitesteket (CD2, CD3, CD4, CD14, CD15, CD16, CD34, CD56, CD61, CD235a és Fc ϵ R1a ellenes antitestek; $10 \mu\text{l}/10^7$ sejt) és inkubáltuk 5 percig 4°C -on. Miután lejárt az inkubáció 10^7 sejtenként $30 \mu\text{l}$ puffert és $20 \mu\text{l}$ anti-biotin mágneses gyöngyöket adtunk a sejtekhez. 10 perc 4°C -on történő inkubáció után MACS oszlopokkal (Miltenyi Biotec) szeparáltuk a B sejteket (negatív szelekció). Azokat a B sejteket, amelyeket nem használtunk fel patch-clamp mérésekhez, TRIzol™ reagensben vettük fel és -80°C -on tároltuk az RT-qPCR kivitelezéséhez.

4.3 Primer GBM és U-87 GM sejtek tenyésztése

A primer és sejtvonal GBM sejteket T75-ös flasksokban tenyésztettük DMEM médiumban, melyhez 10% FBS-t, 1% glutamátot, 1% penicillin-sztreptomycin és 1% nem-esszenciális aminosavakat adtunk. A primer GBM sejteket 3 passzázs, míg az U-87 MG sejteket 10 passzázs erejéig használtuk. A sejteket sejtkubátorban tartottuk 37°C és 5% CO_2 beállítást alkalmazva. A sejtpasszázszt sterilfülkében végeztük, amely a következőképpen történt: a GBM sejtekről Pasteur vagy 2ml-es szerológiai pipetta (VWR International, Radnor, PA, USA) segítségével eltávolítottuk, majd 1x PBS-es mosás után 1x tripszin-EDTA oldatot (0,05% tripszin, 0,02% EDTA) pipettáztunk a flasksába, és 2 percig inkubáltuk 37°C -on. Miután felváltak a sejtek átraktuk őket 15 ml-es centrifugacsövekbe, és 5 percen keresztül fúgáltuk őket 145 RCF-en. A felülúszó leszívása után a sejteket felvettük a médiumban, és egy új sejtenyésző flasksába helyeztük őket.

4.4 Csendesítés siRNS alkalmazásával

Az U-87 MG sejteket Gibco® Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) médiumban transzfektáltuk, mely tartalmazott $2 \mu\text{l}/\text{ml}$ DharmaFECT™-et (Horizon Discovery, Lafayette, CO, USA) és $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ negatív kontroll (AccuTarget™ Negative Control siRNA, Bioneer, Daejeon, Dél-Korea) vagy célzottan KCNMA1, KCNMB1-3 ellenes siRNSt. A

sejteket 37 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül. A csendesítés sikerességét Western blottal ellenőriztük.

4.5 Elektrofiziológiai mérések

4.5.1 Mérési rendszer felépítése

Az elektrofiziológiai mérésekhez konvencionális patch-clamp technikát alkalmaztunk, teljes-sejt konfigurációban. A mérőrendszer egy Axopatch 200B (Molecular Devices, CA, USA) erősítőn alapul, mely Digidata 1550B (Molecular Devices) digitalizálón keresztül csatlakozik a számítógéphez, amin a Clampex 10.7 (Molecular Devices) program segítségével végeztük az adatgyűjtést. A sejtek kiválasztása és a mérőpipetta pozicionálása Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokió, Japán) mikroszkóp és Burleigh PCS-5000 mikromanipulátor (Thorlabs Inc., Newton NJ, USA) segítségével történt, mely rezgésmentes asztalon (Newport Corporation, Irvine, CA, USA) helyezkedett el, és Faraday-kalitka vette körül a zajszűrés érdekében. A sejteket CELLSTAR® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) Petri csészében helyeztük el, és letapadásuk után 2 ml kontroll extracelluláris oldattal töltöttük fel a Petri csészét. Az oldatcsere manuális, gravitáció alapú perfúziós rendszeren keresztül történt, melynél az áramlási sebesség ~0.2 ml/perc volt. A konstans folyadékszint megtartásához vákuumos elszívó rendszert használtunk. A perfundálás során bekövetkező junkciós potenciál okozta feszültséghiba kiküszöböléséhez a referencia elektródát külön edényben tároltuk melyet agar híddal (3 M KCl) csatlakoztattunk a mérőedényhez. A mérőpipetták elkészítéséhez GC 150F-15 boroszilikát üvegkapillárisokat (Harvard Apparatus, MA, USA) és P-87 Flaming/Brown mikropipetta húzót (Sutter Instruments, CA, USA) használtunk. A pipetták ellenállása mérőoldattól függően 3-8 MΩ között volt, ezért a soros ellenállás felső határa, amit még elfogadtunk, is változó volt (B sejtek mérésénél 10 MΩ, a glioblastoma sejteknél 20 MΩ). Mérés során 60-65 %-os soros ellenállás korrekciót alkalmaztunk, ha nem lépett fel oszcilláció.

4.5.2 Elektrofiziológiai mérések során használt oldatok

A B limfociták méréséhez az alábbi oldatokat alkalmaztuk:

Kontroll (extracelluláris) oldat: 145 mM (mmol/liter) NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES; pH=7,35 (NaOH-val titrálva)

Pipetta (belső) oldat: 145 mM KF, 5 mM Na-aszpartát, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂ és 1 mM CaCl₂; pH=7,22 (KOH-val titrálva)

Na⁺ mentes oldat (pozitív kontroll): 145 mM kolin-klorid, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES; pH=7,35 (kolin bázissal titrálva)

Magas K⁺ koncentrációjú extracelluláris oldat (MK, membránpotenciál mérésekhez): 150 mM KCl, 10 mM HEPES, 5,5 mM glükóz, 1 mM CaCl₂ és 1 mM MgCl₂; pH=7,35 (KOH-val titrálva)

A TTX-et a megfelelő koncentrációkban (5, 15, 50, 150 nM) a kontroll oldatban hígítottuk ki.

A glioblasztóma sejtek méréséhez használt oldatok összetétele:

Kontroll (extracelluláris) oldat: 145 mM Na-aszpartát, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES; pH=7,4 (NaOH-val titrálva)

Szabad [Ca²⁺] mentes pipetta (belső) oldat: 145 mM KF, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂ és 1 mM CaCl₂; pH=7,22 (KOH-val titrálva)

1 μM szabad [Ca²⁺] pipetta (belső) oldat: 145 mM K-aszpartát, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 8,5 mM CaCl₂; pH=7,2 (Tris-el titrálva)

Magas (~10 μM) szabad [Ca²⁺] pipetta (belső) oldat: 145 mM K-aszpartát, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 9,8 mM CaCl₂; pH=7,2 (Tris-el titrálva)

K_{Ca}1.1 modulátorokat a kontroll oldatban hígítottuk ki minden mérőnapon a következő koncentrációkban: AA (30 μM), LCA (75 μM), IbTx (~20 nM), Pax (1 μM), DTT (20 mM).

Az oldószereket, melyekkel a törzsoldatokat készítettük el (dimetil-szulfoxid vagy etanol) 1 V/V%-ban hozzáadtuk a kontroll oldathoz a modulátorok tesztelése során. Hacsak másképp nincs írva, a méréseket 1 μM szabad [Ca²⁺] pipetta (belső) oldat használatával végeztük.

4.5.3 Feszültség- és áramprotokollok

B sejt mérések:

Feszültség-zár üzemmódnál általánosan -100 mV tartópotenciált alkalmaztunk, míg áram-zár üzemmódnál nulla nA áramot injektáltunk ($I=0$). A mintavételezést és a zajszűrést (erősítőbe beépített négy pólusú aluláteresztő Bessel szűrő) a Nyquist-szabálynak megfelelően választottuk ki, miszerint 20 kHz-en történt a mintavételezés és 5 kHz-re állítottuk be a Bessel szűrőt. A mérések szobahőn történtek. A használt feszültségprotokollokat, mint lépcsőprotokoll, I-V (aktiváció feszültségfüggése), SSI („steady-state inactivation”, inaktiváció feszültségfüggése) és inaktivációból való visszatérés vizsgálata, az 1. táblázat tartalmazza.

Protokoll neve	Tartófeszültség (mV)	Depolarizáció (mV)	Impulzus hossza (ms)	Impulzusok közti intervallum (mp)
Lépcső	-100	0	15	15 vagy minimum (~4.8 Hz)
I-V	-100	(-)70 – (+)50 ($\Delta 10$ mV)	15	15
SSI	(-)120 – (+)20 ($\Delta 10$ mV)	0	15	15
Inaktivációból való visszatérés	-100	0 és 0 impulzuspár	8	15 impulzuspárok között 1-300 ms impulzuspáron belül

1. Táblázat: *B sejt mérésekhez használt feszültségprotokollok*

Glioblasztóma mérések:

Általánosan -100 mV tartópotenciált alkalmaztunk. A mintavételezés 20 és 50 kHz-el történt. A mérések szobahőmérsékleten történtek. A különböző feszültség protokollokat a 2. táblázat tartalmazza.

Protokoll neve	Tartófeszültség (mV)	Depolarizáció (mV)	Impulzus hossza (ms)	Impulzusok közti intervallum (mp)
Lépcső (farmakológia)	-100	+100	100 vagy 200	5
Lépcső (inaktiváció)	-180	+180	20	5
I-V	-100	(-)100 – (+)100 (Δ20 mV)	100	5

2. Táblázat: A glioblasztóma mérésekhez használt feszültségprotokollok

4.5.4 Az adatok kiértékelése

A patch-clamp adatok kiértékelése és ábrázolása, valamint a statisztikai analízis Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA), Clampfit 10.7 (Molecular Devices, CA, USA) és Graphpad Prism7 (Graphpad, CA, USA) szoftverekkel történt. A nyers adatokat elsőnek „offline” digitálisan szűrtük Clampfitben 5 pontos boxcar funkcióval.

Az ioncsatorna modulátorok hatásának elemzéséhez minden esetben kiszámoltuk a maradó áramhányadokat (MÁH) a következő egyenlet alapján: $MÁH = I_{modulátor} / I_{kontroll}$, ahol az $I_{modulátor}$ a szaturált ionáram modulátor perfúzió során, míg az $I_{kontroll}$ a modulátor alkalmazást megelőző csúcsáram.

Az I-V adataiból elsőnek G-V görbéket készítettünk, melyhez a konduktanciákat a következő egyenlet alapján kaptuk meg: $G = I / (V_{parancs} - V_{reverz})$, ahol a G a konduktancia, I a csúcsáram, $V_{parancs}$ a parancsfeszültség és V_{reverz} az egyensúlyi (reverzál) potenciál. A V_{reverz} értékét a használt mérőoldatok összetétele alapján a Nernst egyenlettel határoztuk meg ($V_{reverz} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[X]_{EC}}{[X]_{IC}} \right)$; ahol R az egyetemes gázállandó, T a hőmérséklet Kelvinben, z az ion töltése, F a Faraday állandó, valamint $[X]_{EC}$ és $[X]_{IC}$ az adott ion koncentrációja extra- és intracellulárisan). A G-V görbék elkészítéséhez az összes parancsfeszültségen kapott konduktancia adatot a legnagyobb konduktanciára normáltuk (G/G_{max} = nyitási valószínűség). Az SSI adatok ábrázolásához az Y-tengelyen feltüntetett I/I_{max} -ot (azaz az aktiválható csatornahányadot) kiszámoltuk, ahol az I a csúcsáram az adott impulzus során, míg az I_{max} a csúcsáram az első

impulzus során. A G-V és SSI görbékét a Boltzmann egyenlettel ($Y = 1/(1 + \exp((V_{50} - V_{parancs})/k))$); ahol a k a görbe meredekségét jellemző állandó) illesztettük meg a V_{50} értékek meghatározásához.

Az inaktivációból való visszatérés időállandóját (τ_v) a következőképpen kaptuk meg: az impulzuspár második tagját (I) az első tagjára (I_{max}) normáltuk minden egyes impulzuspárnál (I/I_{max} =visszatért csatornahányad), majd a kapott görbét egyfázisú exponenciális egyenlettel illesztettük meg ($Y = A \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_v}\right)\right) + Y_0$; ahol A görbe amplitúdója, t az impulzusok között eltelt idő, τ_v a visszatérés időállandója és Y_0 az I/I_{max} t=0-nál). A $K_{Ca1.1}$ áram inaktivációját jellemző időállandót (τ_i) a következő egyenlettel kaptuk meg: $Y = A \left(\exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)\right) + C$; ahol a C a szaturáció értéke.

4.6 Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

A teljes-sejt RNS, beleértve a hírvivő RNS-t is, TRIzol™ reagens segítségével izoláltuk a sejtekből. Az RNS minták tisztaságát UV spektroszkópiával (NanoDrop 2000 spektrofotométer) ellenőriztük vissza, melynek során kizárólag azokat a mintákat fogadtuk el, melyeknek az A260/A280 aránya 1.8 és 2.1 között volt. Ezután az RNS mintákat az qPCR mérések kivitelezéséig -80 °C-on tároltuk.

4.6.1 GBM sejtek

A komplementer DNS-t (cDNS) Superscript III™ Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) használatával készítettük el. A PCR-hez PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és génspecifikus primereket használtunk, melyeknek szekvenciáját a 3. táblázat tartalmazza. Pozitív kontrollnak a GAPDH-t használtuk. A reakciót QuantStudio 3 készüléken futtattuk a következőképpen: 40 ciklus denaturáció (30 mp/ciklus) 95 °C-on, primertapadás 55 °C-on 45 másodpercig és meghosszabbítás 72 °C-on 60 másodpercig. Az adatok kiértékeléséhez QuantStudio Design and Analysis szoftvert használtunk.

Gén neve	Forward primerek	Reverz primerek
KCNMA1	GCTCAAGTACCTGTGGACCG	CTGGTTTGAGAGTGCCATCC
KCNMB1	CTGTACCACACGGAGGACACT	AGGTGCGGAGAAGTAGA
KCNMB2a	TGACAACTACCGGAGGTCTT	GGAGGTCATGGTCCCTGATT
KCNMB2b	GAGAAAGAGCAACAAAGCGG	TTAGCAAATCCCAGACATTGC
KCNMB3a	AAATCACACTTCAGGGCAGC	GCACATCTAGTGGGTCTCCA
KCNMB3b	TCTGAGTGTGAGGGGCTCTT	GCACATCTAGTGGGTCTCCA
KCNMB3c	TCACGAGACACAGGTAGGCAGCAA	TGGCAAACCCCAGCATCACGG
KCNMB3d	GCTCACGAGACACAGGACAGCCTT	TGGCAAACCCCAGCATCACGG
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATT	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC

3. Táblázat: Az U-87 MG sejtek qPCR-éhez használt primerek szekvenciái

4.6.2 B sejtek

Az Nav ioncsatornák mRNS szintű expressziójának kvantifikálásához elsőnek az RNS mintákból cDNS-t készítettünk, reverz transzkriptáz enzimet tartalmazó kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Vilnius, Litvánia) segítségével. Az RT-qPCR-hez LightCycler 480 SyBR Green I Master mix-et (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) és génspecifikus primereket (10 μ M, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) alkalmaztunk. A használt primereket a 4. táblázat foglalja össze. A reakciót LightCycler 96 RT-qPCR (Roche Diagnostics) készüléken futtattuk. A PCR ciklusok a következőképpen néztek ki: az 10 perc inkubálás 95 °C-on, majd 40 darab 10 másodperces ciklus volt 95 °C-on, végül 1 perc 60 °C-on. Pozitív kontrollnak a 36B4 gén által kódolt acidikus riboszómális foszfoprotein P0-t (RPLP0) használtuk. Minden mérést N=2 szer hajtottunk végre. A küszöb ciklust (Ct) a mérőműszer határozta meg, és minden 35 feletti értéket zajnak tekintettünk.

Gén neve	Forward primerek	Reverz primerek
SCN1A	AGTAGTGAATCGGATCTGGAAG	CCACTACGGGCTGTTCTTCT
SCN2A	CACCCCTGCCCTTTACATTT	AGTTGGTAAGAATCGTGCACA
SCN3A	GCAACAGGAAGAAGCTCAGG	AACAGCTCTCCTAACCCACC
SCN4A	AAGCCTCAGAAGCCAATTCC	CACGAGGTCATACACCATGC
SCN5A	CACAGCTGGTTCGAGACATT	CGGCATACTCAAGCAGAACC
SCN8A	AACAGCACGGTGGACTGC	AATTTCCACCTCAGTTGTAGCC
SCN9A	CAACTTTTAAGGGATGGACGA	TCATATTTGGGCTGCTTGTCT
SCN10A	ATCGTCACTGTGAGTCTGCT	CAGGATTTGGCCAGCTTGAA
SCN11A	GGGTAGCCTTCGGATTTGGA	AATGAGGGTGGTCACAGAGA
36B4 (RPLP0)	ATGCAGCAGATCCGCATGT	TCATGGTGTCTTGCCCATCA

4. Táblázat: *Oligonukleotid szekvenciák a B sejt RT-qPCR-hez.*

4.7 Western blot (WB)

Az U-87 MG sejtekből fehérjét izoláltunk Tris lízis puffer (25 mM merkaptotanol, 1 µl/ml Tween® 20, 10 µl/ml proteáz inhibitor és 50 mM Tris; pH=7,5) és sejtszonikátor segítségével. Az izolálás során a sejtet/mintákat jégen tartottuk, és utána a WB-hoz fel nem használt részt -80 °C-on tároltuk 1 héten keresztül. A WB-hoz elsőnek a felhasználni kívánt fehérjemintát centrifugáltuk 13200 RPM-en és 4 °C-on 20 percen keresztül, majd a felülúszó leszívása után felvettük őket töltőpufferben (6x LB), és a mintát denaturáltuk 98 °C-on 10 percen keresztül. 120-120 µg denaturált fehérjét töltöttünk be a 12%-os ProSieve 50 (Lonza, ME, USA) akrilamid gélbe, melyet elektroforetizáltunk (80 mV 20 percig, majd 120 mV 90 percig). Ezután a gél PVDF (polivinilidén-fluorid) membránra transzferáltuk (100 mV, 90 perc), majd blokkoltuk a membránt 1 órán keresztül 5%-os tejpor TBST-ben (TBST = Tris-pufferelt sóoldat + 0.1% Tween® 20). Blokkolás és háromszoros TBST mosás után következett az éjszakai inkubálás az elsődleges antitestekkel 1:1000 hígításban, 4 °C-on. A következő napon, ismét háromszoros TBST mosás

után, történt a másodlagos antitesttel való inkubálás szobahőn, 2 órán keresztül. Az előhívás előtt a membránt SuperSignal® West Pico kemilumineszcens szubsztráttal kezeltük a gyártó által megadott protokoll alapján. A kemilumineszcencia detektálásához Alpha Innotech FluorChem Q MultiImage III-at alkalmaztunk.

4.8 Sejtszinkronizáció és áramlási citometria

Az U-87 MG sejteket M fázis metafázisába 4 µg/ml (10 µM) kolhicinnel, G0/G1 fázisba pedig sérülésmentes DMEM-mel szinkronizáltuk. A kezelések 24 órán keresztül folytak 37 °C-on és 5% CO₂-n. A szinkronizálás sikerességét propidium-jodidos (PI) festéssel igazoltuk, melyhez először a kezelt és kezeletlen sejteket 80%-os etanollal permeabilizáltuk 20 percen keresztül szobahőmérsékleten, majd 2 µg/ml PI-t adtunk a sejtekhez és 10 percig inkubáltuk őket szintén szobahőn az áramlási citometriás mérésekig. Az adatokat BD FACS Aria III (BD Biosciences, NJ, USA) áramlási citométerrel nyertük ki, 561 nm excitációs és 610/20 nm emissziós szűrőt használva. Az adatok kiértékeléséhez FlowJo V10 (BD Biosciences) programot használtunk.

4.9 Statisztikai analízis

Általánosan, az adatokat átlag ± SEM-ként tüntettük fel. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7 programmal végeztük. A statisztikai értékelés során először elvégeztük a normalitás tesztet (D'Agostino-Pearson), majd kétmintás kétoldali t-próbát vagy egyutas variancia-analízist alkalmaztunk Tukey's post-hoc teszttel a normál eloszlást mutató mintáknál, és Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis teszteket alkalmaztunk a normál eloszlástól eltérő eloszlást mutató mintáknál. A glioblasztóma modulátorainak hatását Wilcoxon próbával analizáltuk. A szignifikanciaszint (α) 5% volt.

4.10 Szerző hozzájárulása

A B sejtek izolálása, sejtek tenyésztése, géncsendesítés, sejtszinkronizáció, elektrofiziológiai mérések kivitelezése, kiértékelése és statisztikai elemzése, valamint a Western blot kísérletek elvégzése saját munka.

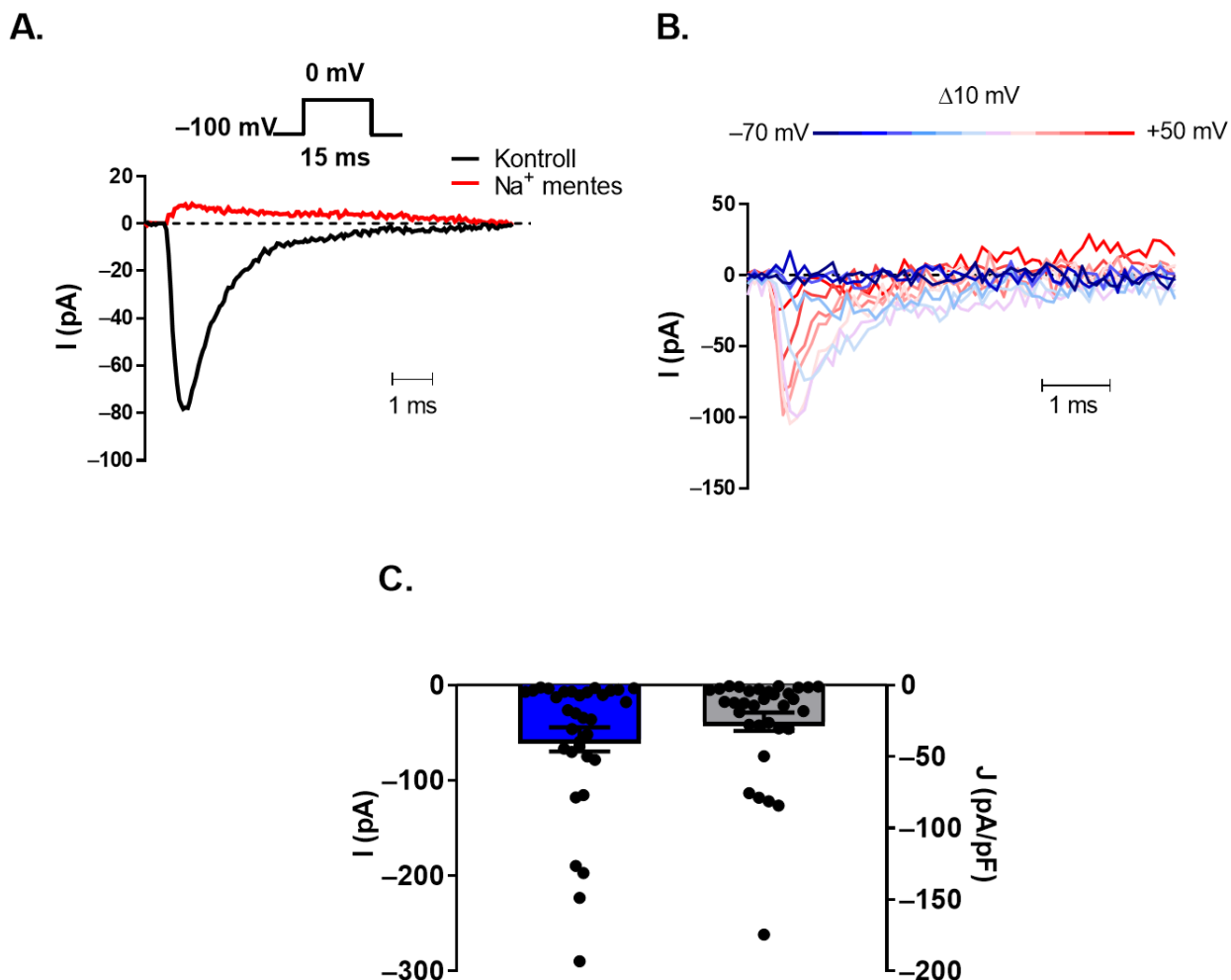
5. EREDMÉNYEK

5.1 A feszültség-kapuzott nátriumcsatornák jelen vannak a humán B sejt membránjában

A patch-clamp mérések során a humán B sejtek jelentős hányadán detektáltunk befelé irányuló áramot, mely gyors aktivációs és inaktivációs kinetikával rendelkezett (6A ábra, fekete vonal). A befelé irányuló ionáram nátrium-mentes külső oldat perfúziójára eltűnt, és megjelent egy kifelé irányuló áram (6A ábra, piros vonal), mely alapján a Na^+ ion a töltéshordozó. A 6B panelen ábrázolt áram feszültségfüggése alapján ezt az ionáramot feszültség-kapuzott nátriumcsatornák adják, mivel az egyre pozitívabb membránpotenciálra való depolarizáció gyorsult aktivációs- és inaktivációs kinetikával társult, ami jellemző a Nav csatornákra. 85 sejtől 33 sejtben találtunk Nav áramot. A legtöbb pozitív sejtnél olyan alacsony volt a csúcsáram (pár pA), hogy a sikeres detektáláshoz 100 impulzust kellett átlagolni, ahhoz, hogy a jel-zaj arányt javítsuk. Amikor ilyen alacsony áramokkal dolgoztunk, a nátrium-mentes oldattal és kontroll oldattal mért 100-100 impulzus átlagát hasonlítottuk össze. Összesítve, ahogyan a 6. ábra C paneljén is látható, a csúcsáram ($-57,0 \pm 12,6$ pA) és áramsűrűség ($-25,7 \pm 6,4$ pA/pF) is nagy variabilitást mutatott a nátriumárammal rendelkező B sejtek körében ($N_{\text{donor}} = 8$, $n_{\text{sejt}} = 33$).

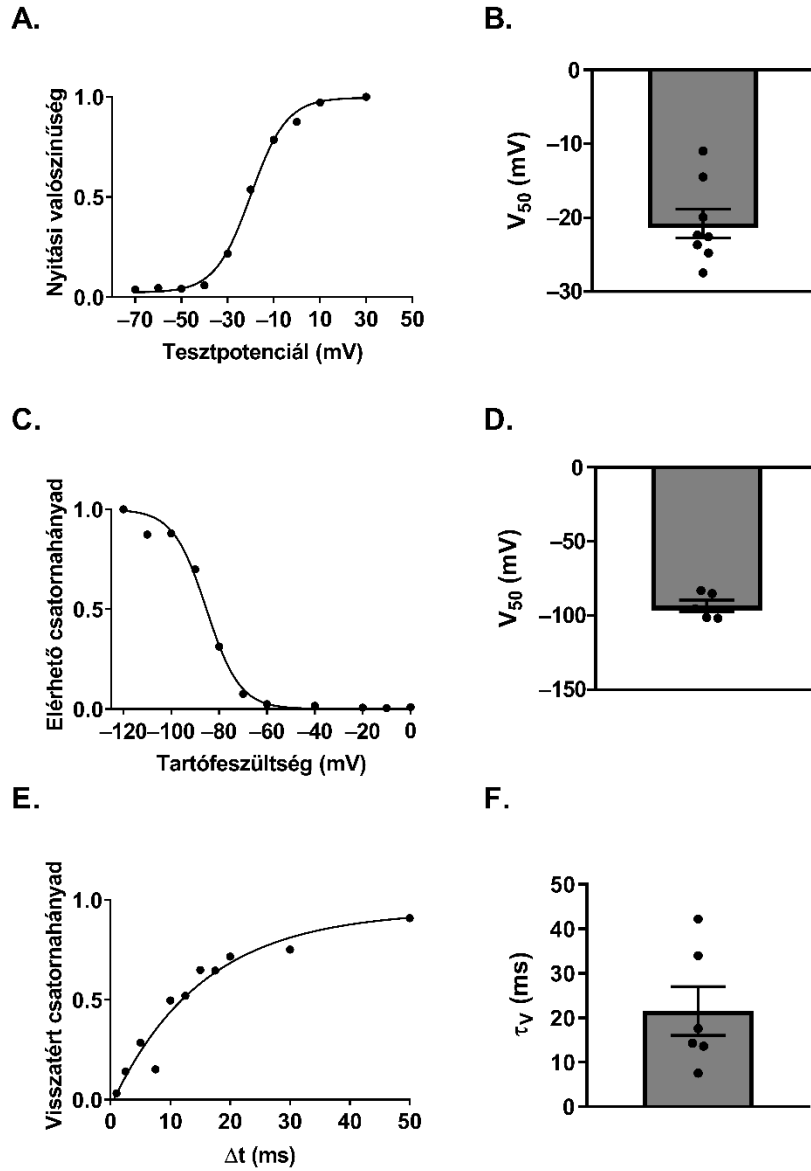
5.2 A B sejt Nav csatornák biofizikai paramétereinek meghatározása

Teszteltük a B sejt Nav ioncsatornáinak biofizikai paramétereit az izoforma azonosítás érdekében. Az 1. táblázatban ismertetett feszültség-protokollokat használva megállapítottuk az aktivációs- és inaktivációs V_{50} értékeket, valamint az inaktivációból való visszatérés időállandóját (τ_v). A G-V görbékét megillesztve $-20,8 \pm 1,9$ mV ($n=8$), az SSI görbékét megillesztve pedig $-93,4 \pm 3,9$ mV ($n=5$) V_{50} értékeket kaptunk (7. ábra A-D panelek). Az I/I_{max} -ot ábrázolva, és megillesztve a τ_v értéke $21,5 \pm 5,5$ ms ($n=6$) volt. A τ_v nagy tartományon belül mozgott (7,5-42 ms), ami többféle izoforma jelenlétét feltételezi (7. ábra E és F panel).



6. ábra: Feszültség-kapuzott nátriumcsatornák jelen vannak a B sejt membránjában.

(A) Befeje irányuló áram 0 mV-os depolarizáció hatására. A fekete áramgörbét a kontroll oldattal, piros áramgörbét a Na^+ mentes oldattal perfundált sejtben mértük. (B) A nátriumáram feszültségfüggése. A negatív tesztspotenciálokat kézzel, míg a pozitívokat pirossal jelöltük. (C) A csúcsáramok (bal oszlop) és áramsűrűségek (jobb oszlop) összesítése 0 mV-on. Az adatokat átlag $\pm$ SEM-ként tüntettük fel. Minden pont egyedi sejt méréséből származó adat.



7. ábra: A nátriumáram biofizikai karakterizálása.

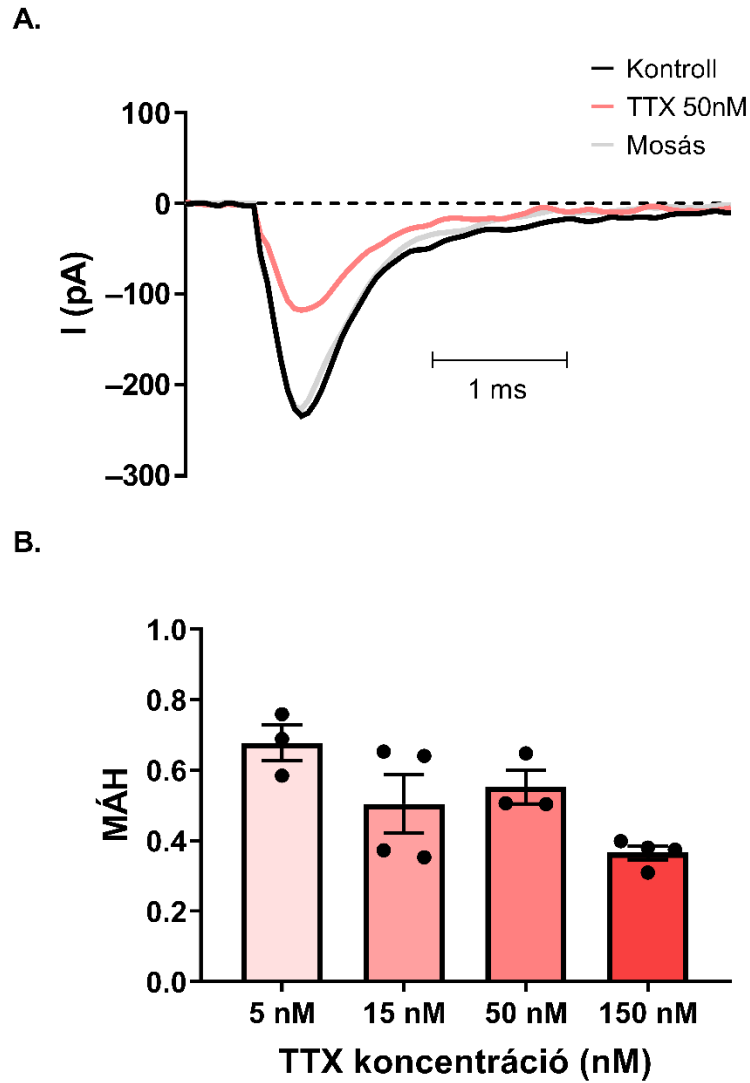
(A) Reprezentatív G-V görbe egy sejt adatai alapján. (B) G-V görbékéből meghatározott aktivációs V_{50} értékek összesítése. (C) Reprezentatív SSI görbe egy sejt adatai alapján. (D) SSI görbékéből meghatározott inaktivációs V_{50} értékek összesítése. (E) Inaktivációból való visszatérés ábrázolása egy sejt adatai alapján. (F) τ_v értékek összesítése. (B, D és F) Az adatokat átlag $\pm$ SEM-ként tüntettük fel. Minden pont egyedi sejt méréséből származó adat.

5.3 A B sejteken mérhető nátriumáram TTX érzékeny

Az Nav ioncsatornák TTX érzékenységek alapján is megkülönböztethetők, ezért 5-150 nM koncentrációjú TTX perfúziójával vizsgáltuk azokat a sejteket, melyek legalább ~100 pA makroszkópos árammal rendelkeztek. A 8. ábra A paneljén láthatunk egy reprezentatív mérést 50 nM TTX használatával. A TTX reverzibilis gátlást okozott nM-os koncentrációban, amiből TTX szenzitív izoformák expressziójára következtethetünk. A TTX dózis-hatás függését is vizsgáltuk: 5, 15, 50 és 150 nM TTX-et perfundáltunk a B sejtekre, majd kiszámoltuk a MÁH-ot 0 mV-on minden mérésnél. Ezek az értékek sorrendben a következők lettek: $0,67 \pm 0,05$ (n=3); $0,50 \pm 0,08$ (n=4); $0,55 \pm 0,05$ (n=3) és $0,36 \pm 0,02$ (n=4) (8. ábra B panel). 150 nM-os TTX koncentrációnál a MÁH nagyobb volt annál, mint ami a pusztán TTX-szenzitív csatornák jelenléte esetén várható, így arra következtettünk, hogy TTX-rezisztens Nav ioncsatornák is hozzájárulhatnak a B sejt nátriumáramához.

5.4 Membránpotenciál mérések az Nav csatornák potenciális kanonikus funkcióját mutatják

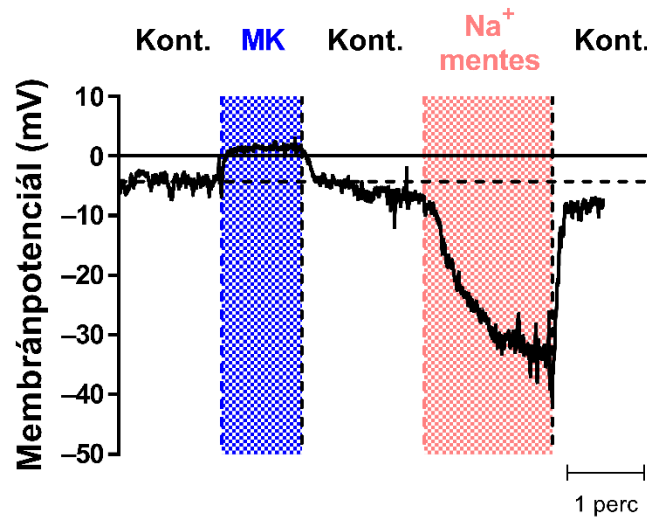
Ahhoz, hogy megállapítsuk van-e a B sejt Nav ioncsatornának kanonikus funkciója; azaz hozzájárulnak-e a membránpotenciál szabályozásához; megmértük a B sejtek membránpotenciálját áram-zár üzemmódban 0 pA áram injektálásával (I=0 üzemmód). Az átlag nyugalmi membránpotenciál (E_m) a legtöbb sejtípushoz képest pozitívabb volt már kontroll körülmények között is ($-6,8 \pm 1,5$ mV; n=13) (9. ábra). A magas kálium koncentrációjú oldat (MK) perfúziójára a sejtek depolarizálódtak, ami a K^+ csatornák szerepére utal a membránpotenciál szabályozásában, míg nátrium-mentes oldat hatására az E_m negatívabb tartományokba tolódott ($\Delta E = E_{\text{nátrium-mentes}} - E_m = -24,7 \pm 3,2$ mV; n=13). Ez a változás reverzibilis volt, azaz a kontroll oldat újbóli perfúziójára az E_m visszatért a kiindulási értékre. Ezekből következik, hogy az Nav csatornák kanonikus funkcióval rendelkeznek a humán B sejtben, és a nyugalmi membránpotenciált pozitív irányba tolják el.



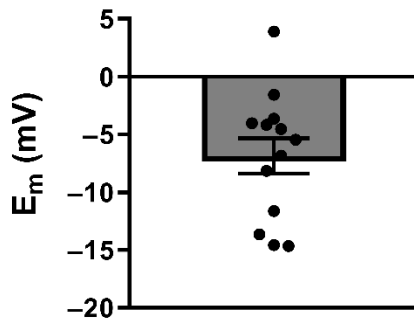
8. ábra: A B sejt Na_v ioncsatornáinak TTX érzékenysége.

(A) 50 nM TTX hatása egy sejt mérése alapján. 0 mV-os depolarizáció során figyelhetjük meg a nátriumáramot kontroll oldat (fekete), 50 nM TTX (piros) és TTX kimosás (kontroll oldat, szürke) során. (B) A MÁH TTX koncentrációfüggése. Minden MÁH értéket 0 mV-on határoztunk meg. Az adatokat átlag $\pm$ SEM-ként tüntettük fel. Minden pont egyedi sejt méréseiből származó adat.

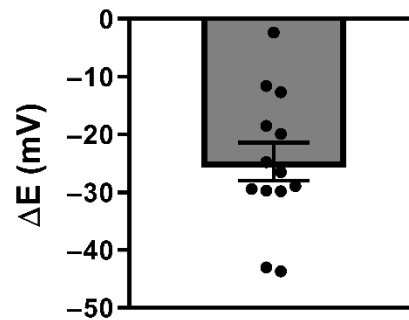
A.



B.



C.

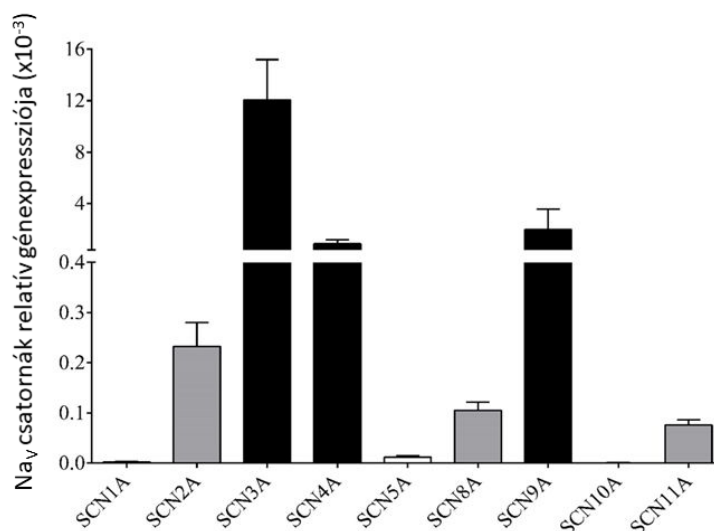


9. ábra: Humán B sejtek membránpotenciáljának mérése.

(A) Reprezentatív $I=0$ áram-zár mérés. Fehér háttérrel a kontroll oldattal (Kont.) kapott E_m értékek, míg kék és piros háttérrel a magas káliumkoncentrációjú (MK) és Na^+ mentes oldatokkal kapott membránpotenciál értékek szerepelnek. (B) Nyugalmi membránpotenciál értékek (E_m) összesítése kontroll körülmények között. (C) A nátrium mentes oldat hatása a membránpotenciálra. Az Y-tengelyen ΔE ($= E_{\text{nátrium-mentes}} - E_m$) értékek szerepelnek. Az adatokat átlag $\pm$ SEM-ként tüntettük fel. Minden pont egyedi sejt méréséből származó adat.

5.5 RT-qPCR megerősítette több Nav izoforma kifejeződését

Az Nav ioncsatornák mRNS szintű expresszióját RT-qPCR-rel erősítettük meg (N=6, 10. ábra). A kilenc vizsgált izoformából hat mutatott detektálható mennyiségű cDNS-t, a referenciagénhez (RPLP0) képest. A hat izoformát kódoló gének a következők voltak: SCN2A (Nav1.2), SCN3A (Nav1.3), SCN4A (Nav1.4), SCN8A (Nav1.6), SCN9A (Nav1.7) és SCN11A (Nav1.9). Az SCN3A, SCN4A és SCN9A gének mutatták a legmagasabb expressziót, míg az SCN2A, SCN8A és SCN11A alacsonyabb szinteken volt jelen. Az SCN1A (Nav1.1), SCN5A (Nav1.5) és SCN10A (Nav1.8) nem volt detektálható, mivel 35 feletti Ct értéket mutattak.

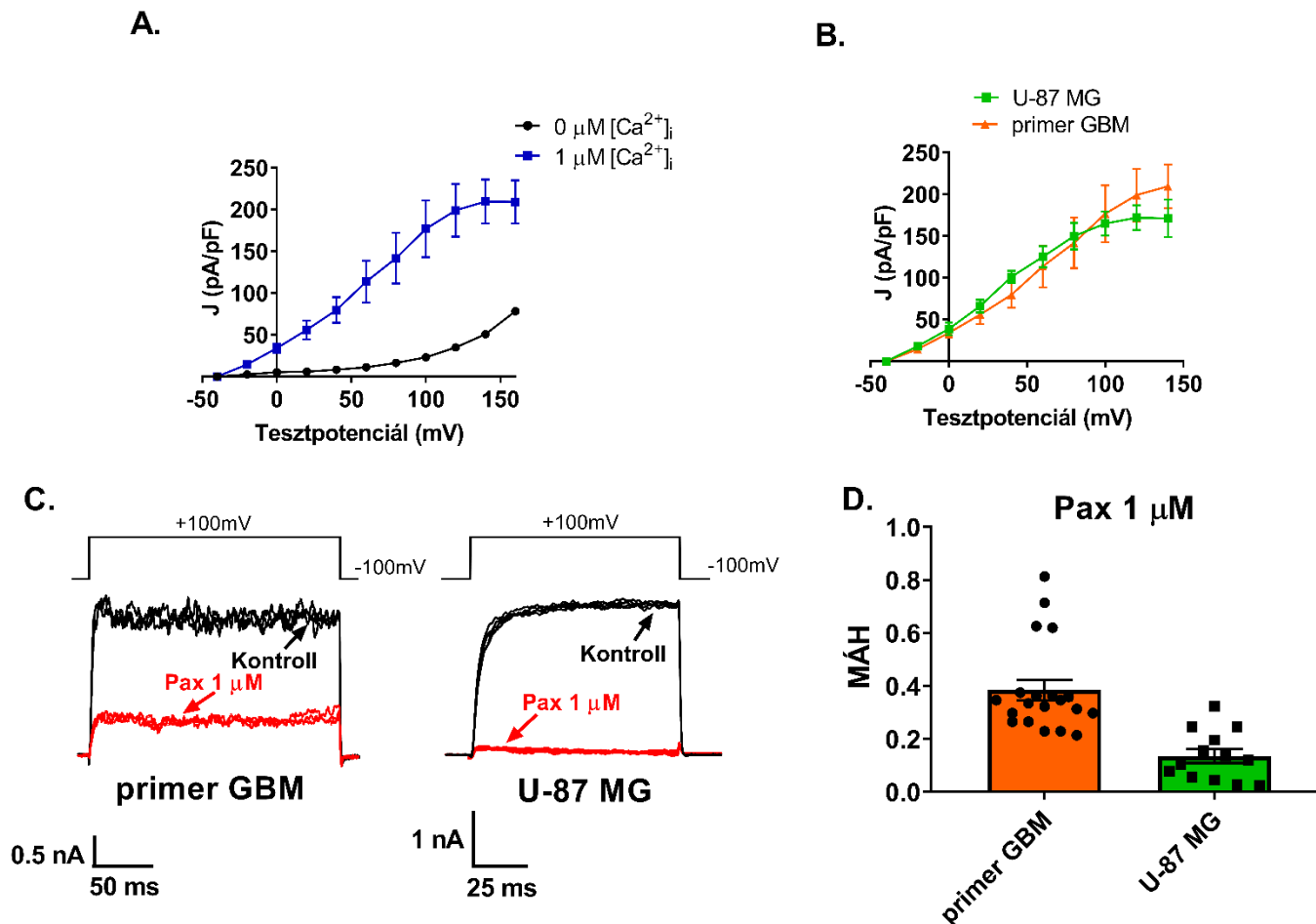


10. ábra: Nav ioncsatornák génexpressziójának analízise RT-qPCR-rel.

A kilenc Nav csatorna mRNS szintű expressziója B sejtekben. Az Y-tengelyen feltüntetett relatív génexpresszió a vizsgált gének átlagos kópiaszámát mutatja normálva a referencia gén expressziójára (RPLP0). A fekete oszlopok (SCN3A, SCN4A és SCN9A) magas, míg a szürke oszlopok (SCN2A, SCN8A és SCN11A) alacsony expressziót reprezentálnak. Az adatokat átlag ± SEM-ként tüntettük fel (n=6).

5.6 A $K_{Ca1.1}$ a domináns káliumcsatorna a glioblasztóma sejtmembránjában

A GBM sejtekkel történő kísérletsorozat során, elsőnek igazoltuk a $K_{Ca1.1}$ membránexpressziót patch-clamp technikával, teljes-sejtes konfigurációt alkalmazva (11. ábra). Összehasonlítottuk a primer GBM sejtek kifele irányuló áramsűrűségét ($J=pA/pF$) $1\ \mu M$ szabad $[Ca^{2+}]_i$ ($N_{donor}=3$, $n_{sejt}=5$) és szabad $[Ca^{2+}]_i$ -mentes ($N_{donor}=5$, $n_{sejt}=11$) környezetben (11. ábra A panel). A t-próba alapján már $-20\ mV$ -on szignifikáns különbség volt az áramsűrűségben a két populáció közt ($p=0.0004$), mely karakterisztikus az intracelluláris kalcium- és feszültség-kapuzott $K_{Ca1.1}$ csatornára ($0\ mV$ felett a p értékek 0.0001 alatt voltak). A primer sejtek és az U-87 MG ($n=5$) sejtvonal hasonló J-V görbével rendelkezett (11. ábra B panel), mely megerősíti a sejtvonal alkalmasságát a glioblasztóma modellezésére. A C és D paneleken látható, hogy $1\ \mu M$ Pax jelentősen gátolta mind a primer sejtek, mind a sejtvonal sejtjeinek káliumáramát. A MÁH értéke primer sejteknél $0,38 \pm 0,04$ ($n=20$), U-87 MG sejteknél $0,13 \pm 0,02$ ($n=13$) volt. Ezen adatok megerősítik, hogy a $K_{Ca1.1}$ a domináns K^+ ioncsatorna a GBM sejtek membránjában.



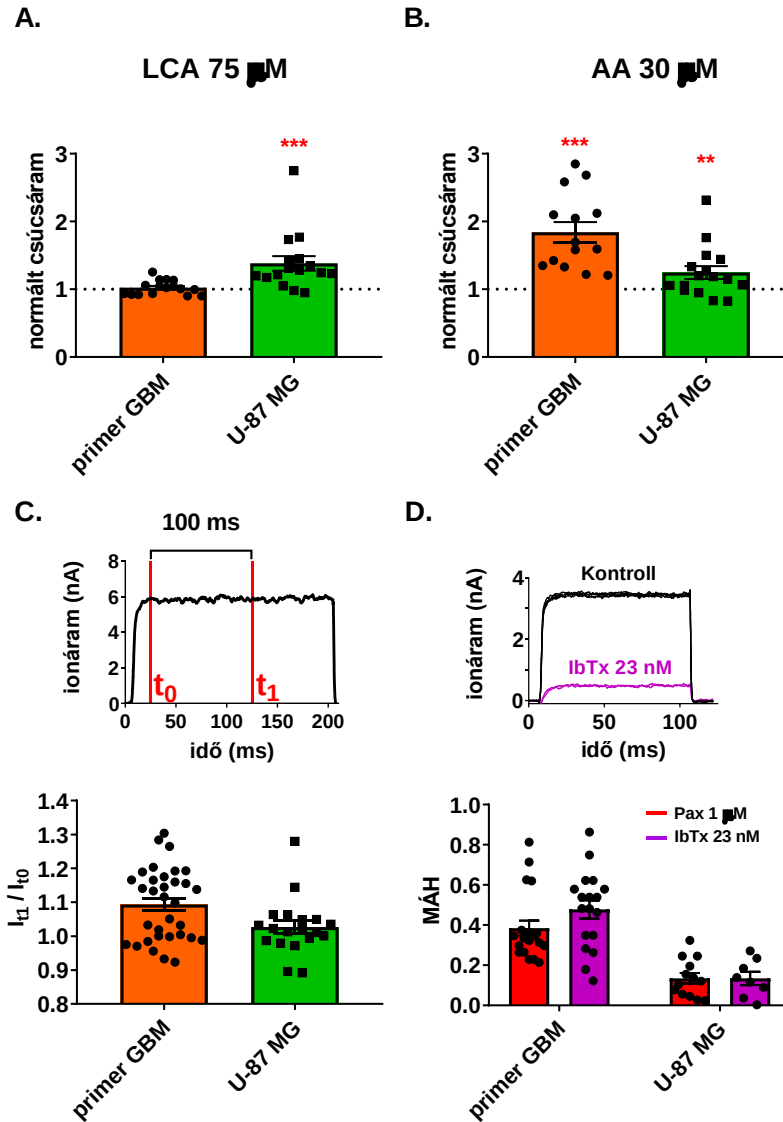
11. ábra: A $K_{\text{Ca}1.1}$ a domináns káliumcsatorna a GBM membránjában.

(A) Primer GBM sejtek áramsűrűség-feszültség (J-V) görbéje. Jól látható a $K_{\text{Ca}1.1}$ ionáramára jellemző erős kalciumfüggés. Kékkel az $1 \mu\text{M}$ szabad belső kalcium-koncentrációval kapott áramsűrűség értékek vannak feltüntetve, míg feketével láthatóak a szabad kalcium mentes oldattal kapott eredmények. (B) A primer GBM (narancs) és az U-87 MG (zöld) sejtek J-V görbéje nagyfokú átfedést mutat. (C) Reprezentatív patch-clamp mérések primer GBM és U-87 MG sejtekről. A feszültség-protokollokat az áramgörbék felett tüntettük fel. Feketével a kontroll körülmények között mért ionáramot, míg pirossal az $1 \mu\text{M}$ paxilline által okozott gátlást láthatjuk. (D) $1 \mu\text{M}$ Pax hatásának összesítése. A fekete pontok az egyedi MÁH értékeket, míg a narancs oszlop a primer GBM sejtek, a zöld oszlop pedig az U-87 MG sejtek MÁH értékeinek átlagát ($\pm$ SEM) jelölik.

5.7 K_{Ca}1.1 béta alegység-függő modulátorok tesztelése

Mivel a K_{Ca}1.1 β alegységeinek GBM sejtmembránban történő kifejeződéséről kevés információ áll a rendelkezésünkre, ezért elsőnek a béta alegység-függő modulátorok hatását teszteltük patch-clamp technikával (12. ábra). Primer GBM sejteknél az AA átlagosan 1,84-szeresére növelte a makroszkópos áramot a kontrollhoz képest ($n=14$, $p=0,001$, kétoldali Wilcoxon próba; 12. ábra B panel), míg az LCA nem okozott szignifikáns csúcsáram emelkedést ($n=16$, $p=0,63$; 12. ábra A panel). Ezzel ellentétben az LCA és az AA is szignifikáns áramnövekedést okozott az U-87 MG sejteknél (átlagosan 1,38- és 1,24-szeres emelkedés, $n_{LCA}=16$ és $p_{LCA}=0.0002$, $n_{AA}=16$ és $p_{AA}=0.008$; 12. ábra A és B panel). Ezek alapján a $\beta 1$ -3 alegységek is kifejeződhetnek a GBM membránjában, ezért megvizsgáltuk az áram inaktivációját, mivel a $\beta 2$ és $\beta 3$ alegységek jelenléte inaktivációt okoz. Az inaktivációs kinetika nem illeszthető jól exponenciális függvényvel, ezért az inaktiváció mértékét az áram nagyságának $t_1 = 125$ és $t_0 = 25$ ms időpontokban meghatározott hányadosa alapján mértük fel (12 C. ábra, felső panel). Ez alapján sem a primer GBM, sem az U-87 MG sejtek K_{Ca}1.1 árama nem inaktiválódott 100 ms alatt +100 mV-os depolarizáció során, ami nem támasztja alá a $\beta 2$ alegységek koexpresszióját az alfa alegységekkel. A $\beta 3$ alegység expresszióra ebből az eredményből azért nem következtethetünk, mert a $\beta 3$ csak magas szabad $[Ca^{2+}]_i$ esetében inaktiválja a csatornát. Teszteltük továbbá az IbTx hatását ~20 nM-os koncentrációban, mely irodalmi adatok alapján ~2-10-szerese a K_d -nak az alfa alegység expressziója esetén, és összehasonlítottuk az 1 μ M Pax által okozott gátlással (12. ábra D panel). (Utóbbi a K_{Ca}1.1 ioncsatornák 100%-át gátolja a használt koncentrációban, negatív tartófeszültséget alkalmazva.) A primer GBM sejtek MÁH értékei nem különböztek szignifikánsan az IbTx (MÁH= $0,47 \pm 0,07$; $n=18$) és a Pax (MÁH= $0,38 \pm 0,04$; $n=20$) alkalmazása során ($p=0,12$, Mann-Whitney próba). (Mivel 1 μ M Pax nem gátolta teljes mértékben az áramot, további kifele irányuló áramot adó ioncsatornák jelenlétét is feltételeznünk kell a sejtmembránban). Hasonlóan, az U-87 MG sejtek MÁH értékei sem tértek el szignifikánsan a két populáció között (IbTx: MÁH= $0,13 \pm 0,03$, $n=8$; Pax: MÁH= $0,13 \pm 0,02$, $n=13$; $p=0,99$, kétoldali t-próba). Ezen adatok kizárják a $\beta 4$ alegységek funkcionális kifejeződését, mivel annak jelenléte megszünteti az áram IbTx-érzékenységét.

Összegezve a farmakológiai modulátorok hatása alapján a $\beta 1$, ($\beta 2$) és $\beta 3$ alegységek kifejeződése lehetséges a glioblasztóma sejtekben.



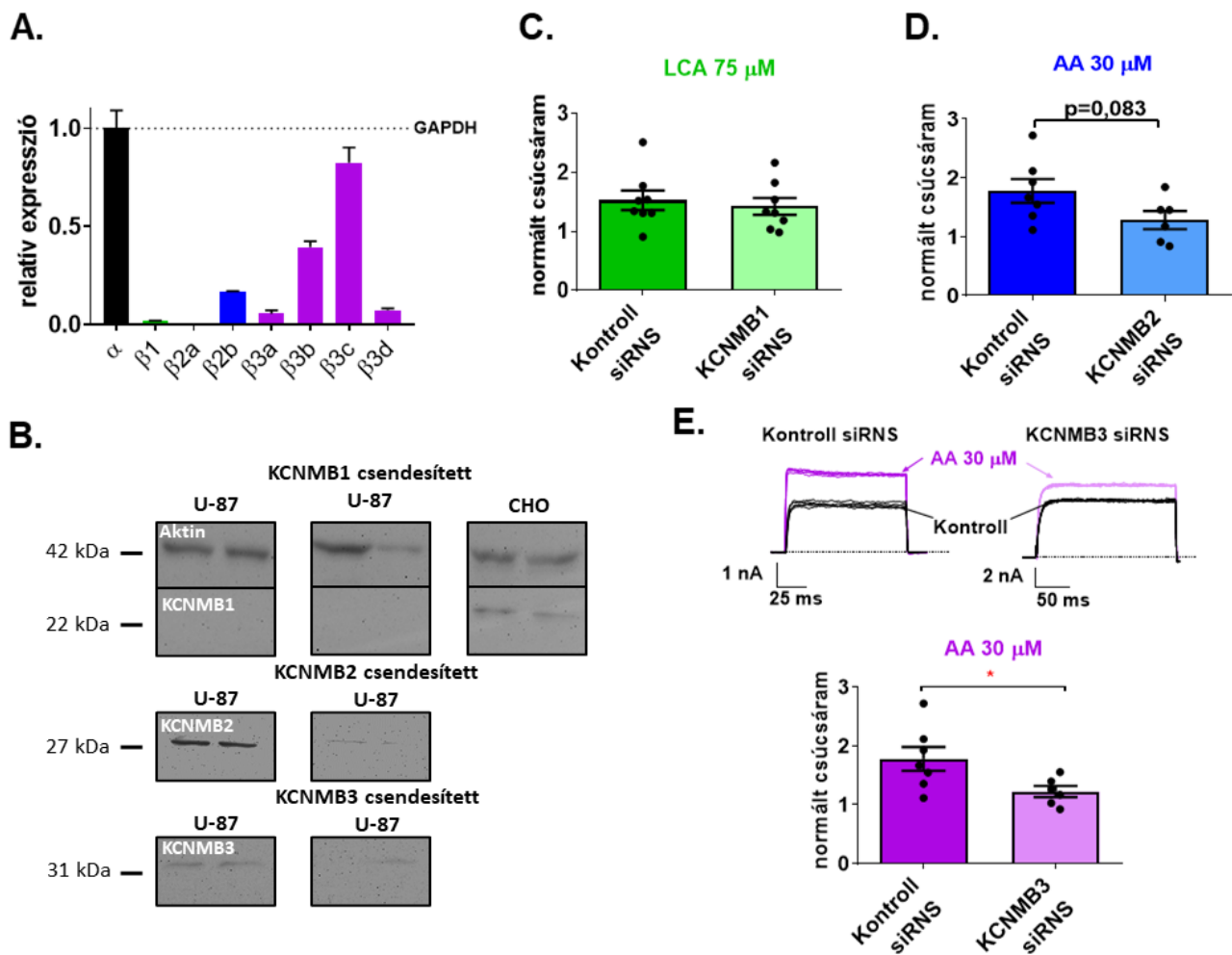
12. ábra: Farmakológiai modulátorok hatása a glioblasztóma ionáramára.

(A-C) A narancssárga oszlopok a primer GBM sejtekkel, míg a zöld oszlopok az U-87 MG sejtekkel kapott eredményeket mutatják. (A és B) Az Y-tengelyen a modulátor által okozott, a kontroll csúcsáramra normált (pontosított vonal), áramnövekedést tüntettem fel. (A) 75 μ M litokólsav hatása a kifelé irányuló csúcsáramra. (B) 30 μ M arachidonsav hatása a glioblasztóma csúcsáramára. (C) Az ioncsatorna inaktiváció mértékét 100 ms alatt +100 mV-os feszültségen az I_{t1}/I_{t0} hányadosból határoztuk meg (felső panel), a kapott hányadosokat az alsó panelen ábrázoltuk. (D) 1 μ M Pax (piros) és 23 nM IbTx (lila) hatásának összehasonlítása. Az Y-tengelyen az egyedi sejtek MÁH értékeit tüntettük fel. Bal oldalon a primer sejtek, jobb oldalon a sejtvonalsajtjeinek az adatai találhatóak. Az oszlopok felett egy reprezentatív IbTx hatás látható U-87 MG sejten. A fekete pontok és négyzetek egyedi sejtek méréséből származó adatok. Az adatokat átlag $\pm$ SEM-ként ábrázoltuk; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.8 A molekuláris biológiai módszerekkel kapott eredmények alátámasztják a $\beta 3$ expresszióját

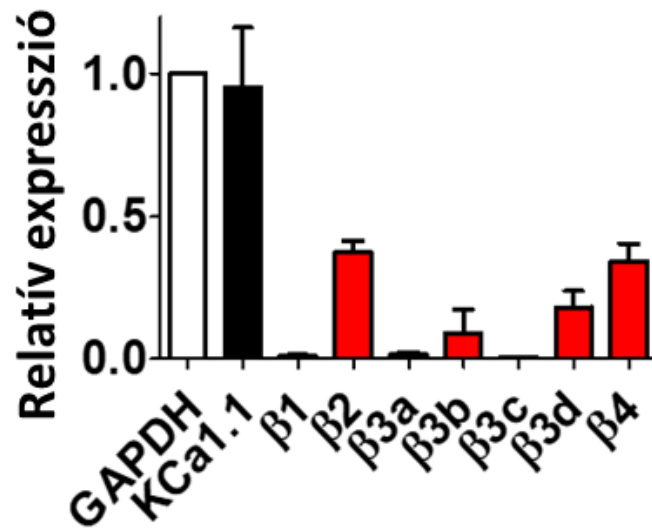
A farmakológiai kísérletek eredményei alapján potenciálisan kifejeződő béta alegységek expresszióját tovább vizsgáltuk molekuláris biológiai módszerekkel (13. ábra). qPCR eredmények alapján a $\beta 1$ alegység alacsony, a $\beta 2$ és $\beta 3$ alegységek magasabb expressziót mutattak mind a primer sejteknél, mind a sejtvonalnál (13. ábra A panel és 14. ábra). Mivel az AA és LCA több ioncsatornára (és $K_{Ca1.1}$ béta alegységre) is hat, ezért az U-87 MG $K_{Ca1.1}$ β alegységeinek kifejeződését siRNS-sel csendesítettük le, majd megint elvégeztük az előző részben ismertetett farmakológiai kísérleteket a β csendesített és a kontroll csendesített („scrambled siRNS”) sejteknél (13. ábra C-E panel). A csendesítés sikerességét a fehérjeexpresszió mérésével, WB-tal ellenőriztük (13. ábra B panel). Az anti-KCNMB2 ($\beta 2$) és anti-KCNMB3 ($\beta 3$) antitestek adtak jelet a kontroll mintákban, melyek az siRNS-sel történő csendesítésre eltűntek. Az anti-KCNMB1 ($\beta 1$) antitest azonban nem adott jelet U-87 MG sejteknél, míg a pozitív kontrollként használt, $\beta 1$ alegységet natívan kifejező, CHO (kínai hörcsög ovárium) sejteknél sikeresen igazoltuk az antitest hatékonyságát. A farmakológiai kísérletek alapján (C-E panel) a KCNMB1 géncsendesítés nem változtatta meg szignifikánsan a választ 75 μ M LCA alkalmazására ($p=0,63$; $N_{csendesítés}=3$, $n_{sejt}=8$; kétoldali t-próba), ami a $\beta 1$ alegység szignifikáns szintű expressziója ellen érvel. A 30 μ M AA áramnövelő hatását a kontroll csendesítéshez képest a KCNMB2 csendesítése nem csökkentette ($p=0,083$; $N_{csendesítés}=3$, $n_{sejt}=6$), míg a KCNMB3 csendesítés esetén a csökkenés statisztikailag szignifikáns volt ($p=0,038$; $N_{csendesítés}=3$, $n_{sejt}=6$). Ugyanakkor a $\beta 3$ alegység csendesítése nem változtatta meg a Pax hatását, mely β alegység expresszió-függetlenül gátolja a csatornát (15. ábra).

Az eddigi eredményeket összegezve, a magasabb RNS szint és az AA hatás csökkentése alapján a $\beta 3$ alegység kifejeződése dominálhat a GBM sejtek membránjában.



13. ábra: Molekuláris biológiai eredmények alapján a β3 a domináns járulékos alegység.

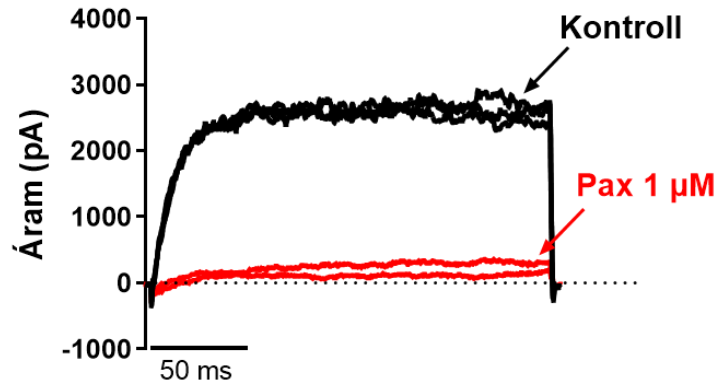
(A) A K_{Ca}1.1 alfa és béta alegységek expressziójának feltérképezése qPCR-rel U-87 MG sejteken. Az Y-tengelyen a vizsgált gének relatív expresszióját tüntettük fel a referencia génhez képest (GAPDH, szaggatott vonal). (B) Western blot a béta alegységek kifejeződéséről. Bal oszlop a kontroll, míg a középső oszlop a béta alegység csendesítés eredményei. Pozitív kontrollként az aktin expressziót használtuk (felső sor). A KCNNB1 antitest pozitív kontrolljaként a CHO sejteket választottuk (jobb oszlop). A Western blottokat duplikátumokban végeztük el. (C-E) LCA és AA hatása a béta alegység-csendesített populációknál. A bal oszlopok a kontroll siRNS-sel kezelt, míg a jobb oszlopok az adott béta alegység csendesített populációk eredményei. Az Y-tengelyen, a kontroll csúcsáramra normált, modulátorok által kiváltott áramemelkedés látható. Az E panelen, az oszlopok felett, egy-egy reprezentatív mérést tüntettünk fel. A bal oldalon a kontroll siRNS, míg jobb oldalon a KCNNB3-csendesített U-87 MG sejt ionáramának változása látható 30 μM AA hatására. A fekete pontok egyedi sejtek méréséből származó adatok, melyeket átlag ± SEM-ként prezentáltunk; *p<0,05.



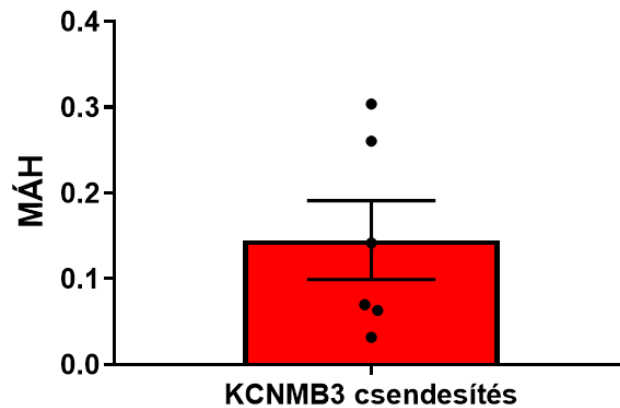
14. ábra: A primer GBM sejtek PCR eredménye hasonlóságot mutat az U-87 sejtekével.

A K_{Ca}1.1 (fekete oszlop) és béta alegységeinek (piros oszlopok) kifejeződését normáltuk a referencia gén (GAPDH, fehér oszlop) kifejeződésére. (N=3)

A.



B.



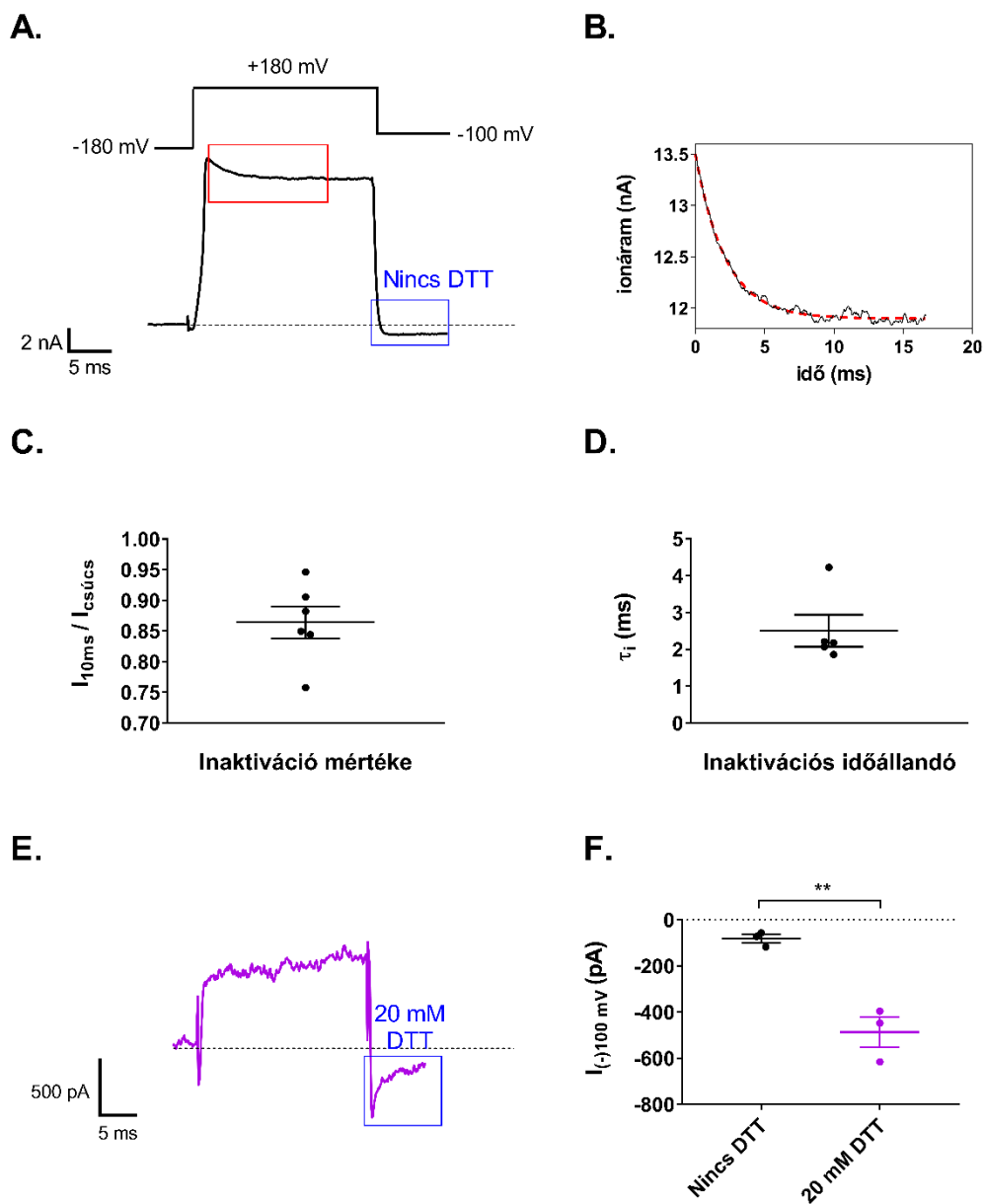
15. ábra: A paxilline hatása a KCNMB3 csendesített U-87 MG sejtekre

(A) KCNMB3 csendesített U-87 MG sejt reprezentatív patch-clamp mérése. A feketével a kontroll áram, míg pirossal az 1 μM Pax perfúzióval szaturált áram látható. A sejteket -100 mV-os tartópotenciálról depolarizáltuk +100 mV-ra. (B) 1 μM Pax gátlás MÁH értékeinek összesítése ($MÁH = 0,14 \pm 0,04$; $n=6$). Minden pont egyedi sejtek méréséből származó adat, melyeket átlag $\pm$ SEM-ként ábrázoltunk.

5.9 A $\beta 3$ funkcionálisan kifejeződik az U-87 MG sejtek membránjában

A $\beta 3$ alegységek funkcionális kifejeződéséhez igazolnunk kellett a biofizikai paraméterek $\beta 3$ expresszióval járó változását (16. ábra). Ezt speciális patch-clamp protokollokkal hajtottuk végre, melyekben megemeltük a tesztpotenciált (+100 mV-ról +180 mV-ra) és a szabad $[Ca^{2+}]_i$ -t (1 μM -ról 10 μM -ra). Ilyen körülmények között tudtuk detektálni a $\beta 3$ alegységekre jellemző, gyors és inkomplett inaktivációt (16. ábra A-D panel). Az $I_{10ms}/I_{csúcs}$ arány (I_{10ms} = az ionáram 10 ms-al a depolarizáció kezdete után, $I_{csúcs}$ = csúcsáram a depolarizáció kezdetekor) alapján az inaktiváció inkomplett volt ($I_{10ms}/I_{csúcs}=0,86 \pm 0,03$; $n=6$; 14. ábra C panel). Ezen felül, az inaktiváció lecsengését exponenciális függvénnyel megillesztve a τ_i karakterisztikusan gyors volt ($2,5 \pm 0,43$ ms; $n=5$; 16. ábra D panel). Emellett tudott, hogy a $\beta 3$ expresszió egyenirányítást okoz, így vizsgáltuk a farokáram meglétét negatív (-100 mV) membránpotenciálon. A 16. ábra F panel alapján, kontroll körülmények között ez a farokáram átlagosan -82 ± 18 pA volt, mely 20 perc 20 mM DTT kezelés hatására -487 ± 66 pA-re nőtt (16. ábra E és F panel; $n=3$; $p=0,004$; kétoldali t-próba).

Ezen adatok alapján a $\beta 3$ alegység funkcionálisan kifejeződik a GBM sejtek membránjában.

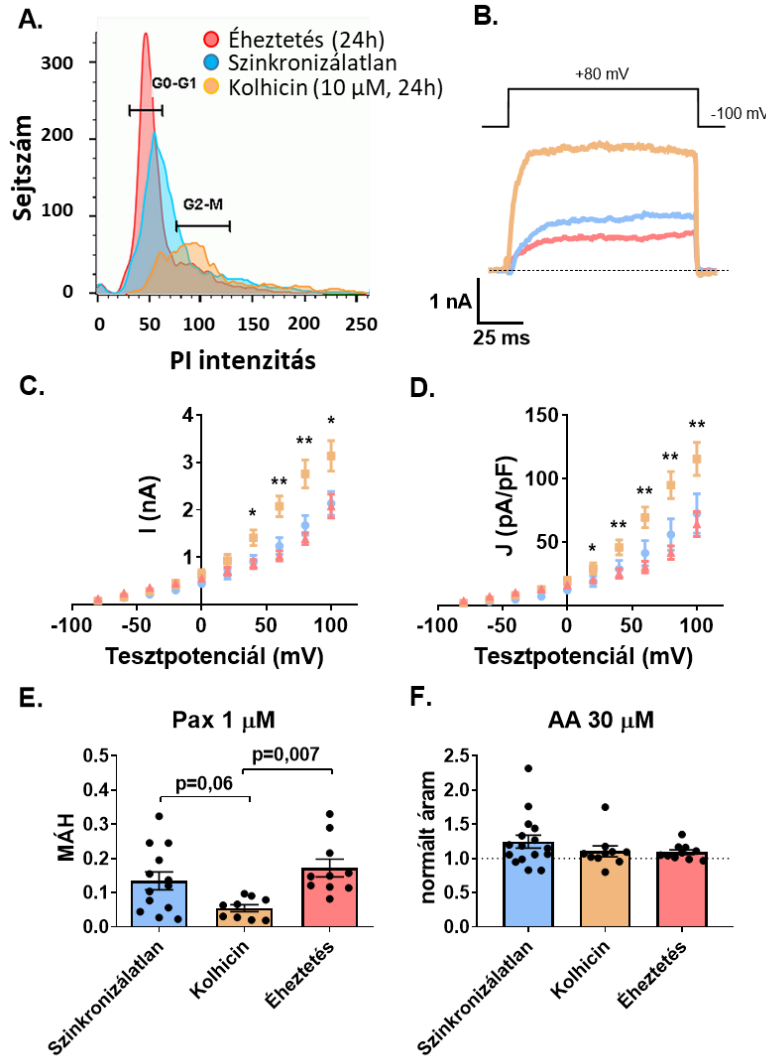


16. ábra: A $K_{Ca1.1} \beta 3$ alegysége funkcionálisan kifejeződik a GBM sejtek membránjában.

(A) Reprezentatív patch-clamp mérés egy U-87 MG sejtről 10 μM intracelluláris szabad kalciumot használva. A feszültség protokoll a mérés felett található. Piros kerettel az inaktivációt, míg kékkel a farokáramot jelöltük. A szaggatott vonal a 0 pA-nek megfelelő áramot jelenti. (B) Az A panelen piros kerettel jelölt inaktiváció nagyítva látható. Piros szaggatott vonal mutatja az illesztést egyfázisú exponenciális egyenlettel. (C) $I_{10ms}/I_{csúcs}$ áramarányok összesítése. (D) Az inaktivációs időállandók (τ_i) összesítése. (E) Reprezentatív mérés egy 20 mM DTT-vel kezelt U-87 MG sejtről. A kék keret mutatja a DTT hatására megjelenő farokáramot. (F) Farokáram amplitúdók összesítése. Fekete pontok a kontroll, míg a lila pontok a 20 mM DTT-vel kezelt sejtek adatai. A szaggatott vonal jelöli a 0 pA áramot. A fekete és lila pontok egyedi sejtek méréséből származó adatok, melyeket átlag $\pm$ SEM-ként ábrázoltunk; ** $p < 0,01$.

5.10 A $K_{Ca1.1}$ expresszió sejtciklusfüggése

Mivel a káliumcsatornák a sejtciklus különböző fázisaiban eltérő aktivitást mutatnak (általában a G1/S fázis határán fokozott, míg M fázisban csökkent az expresszió) [138], megvizsgáltuk a $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna és béta alegységeinek funkcionális kifejeződését U-87 MG sejteken (17. ábra). Ehhez M fázisba kolhicinnel, G0 fázisba pedig szérummentes médium (éheztetés) használatával szinkronizáltuk a sejteket. A 17. ábra A panel hisztogramjai és az 5. táblázat alapján látható, hogy a sejtek $36 \pm 3\%$ -a volt a G2/M fázisban 24 óra kolhicin kezelés hatására ($N_{kezelés}=3$, $n_{minta}=3$), míg kontroll szinkronizálatlan sejteknél ez az érték $16 \pm 1\%$ volt ($N_{kezelés}=3$, $n_{minta}=5$). Szérummentes médiummal szinkronizált sejteknél a G0/G1 sejtek aránya $57,3 \pm 3\%$ -ról $78 \pm 1\%$ -ra nőtt ($N_{kezelés}=2$, $n_{minta}=2$). A kolhicinnel kezelt, M fázisba dúsított sejteknél a makroszkópos káliumáram +40 mV-os depolarizáció felett szignifikánsan magasabb volt, mint a G0 fázisba szinkronizált, valamint a kontroll sejteké (17. ábra B és C panel). Mivel a sejtciklus során nem csak a káliumcsatorna expresszió, de a sejttérfogat és -felszín is változik, ezért összehasonlítottuk az áramsűrűségeket is ($J=pA/pF$, 17. ábra D panel), ahol már +20 mV-tól szignifikánsan eltértek a kolhicinnel kezelt sejtek adatai a többi populációtól. Azért, hogy meggyőződjünk arról, hogy a mért áramok elsősorban a $K_{Ca1.1}$ csatornából származnak, a szinkronizált és szinkronizálatlan populációkat Pax-nel perfundáltuk. Mindegyik sejtpopulációnál prominens gátlást okozott a Pax alkalmazása, azonban a kolhicinnel kezelt sejteknél ez a gátlás szignifikánsan nagyobb volt ($M\Delta H=0,05 \pm 0,01$; $n=9$) a G0 fázisba szinkronizált ($M\Delta H=0,17 \pm 0,02$; $n=10$) tapasztaltnál ($p=0,007$; Kruskal-Wallis próba, 17. ábra E panel). Azonban 30 μM AA perfúzióra mind a három populációnál hasonló csúcsáram emelkedés volt tapasztalható ($I_{AA}/I_{kontroll}$ hányadosok a szinkronizálatlan, kolhicinnel kezelt és éheztetett populációknál: $1,26 \pm 0,09$ ($n=16$); $1,1 \pm 0,08$ ($n=10$) és $1,09 \pm 0,03$ ($n=10$); $p=0,46$, Kruskal-Wallis próba, 17. ábra F panel). Így, az adatok alapján, a $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna funkcionális expressziója nő az M fázisba való szinkronizáció során, a $\beta 3$ alegység expresszió változása nélkül.



17. ábra: A $K_{Ca1.1}$ expresszió sejtciklus-függést mutat.

(A) Áramlási citometriával kapott reprezentatív hisztogramok. Y-tengelyen a sejtszám, X-tengelyen a PI intenzitást tüntettük fel, mely arányos a DNS tartalommal. Az egész ábrán pirossal az éheztetett (szérummentes DMEM, 24 óra), kékkel a szinkronizálatlan és sárgával a 10 μ M kolhicinnel kezelt populációk láthatók. (B) Reprezentatív mérések a három populációról +80 mV tesztpotenciált alkalmazva. A szaggatott vonal a 0 pA-nek megfelelő áramot jelöli. (C és D) A csúcsáram (I , nA), valamint az áramsűrűség (J , pA/pF) feszültségfüggése. (E) 1 μ M Pax hatása a makroszkópos áramra kezelt és kezeletlen U-87 MG sejteknél. Az Y-tengelyen az egyedi MÁH értékek láthatóak. (F) 30 μ M AA csúcsáram moduláló hatása a vizsgált populációknál. Az Y-tengelyen a normált áramot tüntettük fel, mely az arachidonsav perfúzió során szaturált csúcsáram normálva a kontroll körülmények között mért csúcsáramra. A szaggatott vonal jelöli a hatásküszöböt. Az egész ábrán, a fekete pontok egyedi sejtek méréséből származó adatok, melyeket átlag $\pm$ SEM-ként ábrázoltuk; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Szinkronizálatlan	Sejt % (átlag ± SEM)
G ₀ /G ₁	57.3 ± 3.2
S	26.6 ± 2.4
G ₂ /M	16.1 ± 0.9
Éheztetés (24 óra)	
G ₀ /G ₁	77.8 ± 1.3
S	12.2 ± 0.8
G ₂ /M	10 ± 0.6
Kolhicin (10 µM, 24 óra)	
G ₀ /G ₁	33.9 ± 6.3
S	31 ± 2.3
G ₂ /M	35.1 ± 4

5. táblázat: U-87 MG sejtek sejtciklus analízise

A fenti táblázat mutatja a szinkronizálatlan, és szinkronizált U-87 MG sejtek százalékos arányát (átlag ± SEM) a sejtciklus különböző fázisaiban

6. DISZKUSSZIÓ

6.1 Funkcionális Nav ioncsatornák jelen vannak a humán B sejt membránjában

6.1.1 Elektrofiziológiai és molekuláris biológiai adatok bizonyítják a Nav ioncsatornák expresszióját humán B sejtekben

Habár számos tanulmány alapján feltételezték már a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák jelenlétét a humán B sejtek membránjában, közvetlen elektrofiziológiai adatok idáig ezt még nem bizonyították. A kutatásunkban elektrofiziológiai és molekuláris biológiai módszerekkel azonosítottuk a Nav ioncsatornák funkcionális expresszióját a humán B sejtek membránjában. A patch-clampmel mért sejtek mintegy 40%-a mutatott befelé irányuló áramot, mely Na^+ mentes oldatra megszűnt, valamint karakterisztikusan Nav csatornákra jellemző feszültségfüggést mutatott (6. ábra A és B panel). Ezzel ellentétben a T sejtek csupán 3%-án találtak TTX szenzitív nátriumáramot (habár a referált tanulmányban nem használtak protokollokat direkt a Nav csatornák kimutatására, így a tényleges arány magasabb is lehet) [139].

A vizsgált biofizikai paraméterek alapján nem tudjuk egyértelműen azonosítani a sejtmembránban jelenlévő Nav csatornákat (7. ábra). A feszültség-kapuzott ioncsatornák, így köztük a Nav csatornák, kapuzása függ az expressziós rendszertől, ahogy ezen paramétereket befolyásolja a sejtmembrán lipidösszetétele és a járulékos alegységek kifejeződése is. Így a legtöbb, általunk is vizsgált, biofizikai paraméterek értékei nagy átfedést mutatnak a különböző Nav ioncsatornák között. Például adataink alapján az aktivációs V_{50} érték $-20,8 \pm 1,9$ mV volt, mely a legtöbb Nav csatornánál publikált tartományba esik. Egyedül a Nav1.9-nél írtak le negatívabb aktivációs V_{50} értéket, mely körülbelül -40 mV volt [140-143]. Az inaktivációból történő visszatérés időállandója (τ_v) értékei is nagy szórást mutattak (7,5-42 ms), ami alapján több Nav csatorna együttes membránjelenlétét feltételezzük. A biofizikai paraméterek közül az utóbbi érték alapján lehet jobban elkülöníthetőek a Nav csatornák, mivel ismertek gyorsan visszatérő (például Nav1.3 és 1.4; $\tau_v=8-20$ ms [72]) és lassan visszatérő (Nav1.7; $\tau_v \approx 150$ ms [71]) izoformák.

RT-qPCR-rel TTX-szenzitív nátriumcsatornákat kódoló (SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN8A és SCN9A) valamint TTX-rezisztens csatornát kódoló (SCN11A) gének expresszióját mutattuk ki (10. ábra). Ezek közül domináns kifejeződést mutatott a TTX szenzitív Nav1.3, 1.4 és 1.7 ioncsatorna, míg a TTX rezisztens Nav1.9 csatorna alacsonyabb mRNS szinttel volt jelen. A TTX-szenzitív- és rezisztens Nav csatornák együttes jelenléte a membránban magyarázhatja a

farmakológiai eredményeinket, miszerint a TTX 150 nM-os koncentrációban nem okozott akkora gátlást, mint az vártuk volna, ha kizárólag TTX-szenzitív feszültség-kapuzott nátriumcsatornák lettek volna jelen a B sejt membránjában (8. ábra) [144, 145]. A Hill-egyenlet, 150 nM TTX MÁH értékei alapján, 84 nM-os IC_{50} értéket adott, mely lényegesen magasabb a TTX-szenzitív Na_V csatornák publikált IC_{50} értékeinél. Ezen érték szintén alátámasztja a TTX-rezisztens Na_V csatornák alacsonyabb szintű membránexpresszióját. Ismert, hogy az ioncsatornák expressziója változik a sejtek differenciációja során. A K^+ csatornák kifejeződési mintázata például változik a T és B sejtekben [18, 146], valamint a dendritikus sejtekben érés során a Na_V csatornák kifejeződésnek csökkenésével egyidejűleg a K_V csatornák expressziójának fokozódását figyelték meg [59]. Egy későbbi publikációban kimutatták, hogy a Na_V magas expressziója a dendritikus sejtek egy kisebb alpopulációjára ($CD1a^+$) korlátozódik, mely tovább bizonyítja az ioncsatornák kifejeződésének és a sejt-differenciációnak a szoros kapcsolatát [51]. A sejt-differenciáción kívül sejsérülés is kiválthat expressziós mintázatváltozást. Asztrocitákon mechanikai stimulációval kiváltott reaktív gliózis során a TTX-szenzitív Na_V csatornák helyét TTX-rezisztens csatornák vették át [147]. Mivel a tanulmányunkban nem választottuk alpopulációkra a B sejteket, a vizsgált populációnk nagyon heterogén volt, ami magyarázhatja a magas variabilitást a TTX érzékenységben. Ez a heterogenitás állhat a mögött is, hogy a sejteknek csak egy részén láttunk Na_V áramot. A patch-clamppel detektálható nátriumáram lehet, hogy a B sejtek csak egy bizonyos alpopulációján fedezhető fel. A feszültség-kapuzott nátriumcsatornákat funkcionálisan expresszáló alpopuláció(k)nak felderítése fontos feladat a jövőben, a Na_V csatornák funkciójának megismerése érdekében.

6.1.2 A Na_V csatornák lehetséges funkciója a humán B sejtekben

Megmértük a B sejtek membránpotenciálját $I=0$ áram-zár üzemmódban, a Na_V csatornák potenciális kanonikus funkcióját vizsgálva, és azt tapasztaltuk, hogy a nátrium-mentes oldat perfúziója reverzibilis hiperpolarizációt okozott, az eleve pozitívabb nyugalmi membránpotenciállal rendelkező B sejteknél (9. ábra). Irodalmi adatok alapján a limfociták nyugalmi membránpotenciálja széles intervallumba esik: beszámoltak negatív ($E_m=(-)70 - (-)60$ mV [148, 149]), átmeneti ($E_m \approx -40$ mV [19]) és pozitívabb ($E_m=(-)12 - (-)7$ mV [150, 151]) membránpotenciál értékekről is különböző publikációkban. Ennek a variabilitásnak az oka lehet az alkalmazott mérőmódszerek különbözősége. Szeparálatlan perifériás limfocita populáció

vizsgálata során a B sejtek alacsony aránya miatt a pozitívabb nyugalmi membránpotenciál értékek kevésbé gyakoriak. Habár a SSI görbék alapján az általunk kapott nyugalmi membránpotenciálon ($E_m = -6,8 \pm 1,5$ mV) a legtöbb Na_v csatorna inaktivált állapotban van (0 mV-on a Na_v csatorna elérhetőség $0,05 \pm 0,02$ volt), a magas membránimpedancia és az alacsony citoplazma térfogat miatt kevés ioncsatornának az aktivációja is okozhat szignifikáns membránpotenciál változásokat. Elméletileg a Na^+ -mentes extracelluláris oldat közvetett módon is okozhatna membránpotenciál változásokat elektrogén transzport mechanizmusok módosításán (például Na^+/Ca^{2+} cserélő) keresztül. Ezt a lehetőséget vizsgálták dendritikus sejteken, ahol a $Na_v1.7$ -et lecsendesítve a nyugalmi membránpotenciál hiperpolarizálódott, és inszenzitív lett az extracelluláris Na^+ koncentrációra, ami azonban a Na_v csatornák közvetlen szerepére utal, így mi is ezt a mechanizmust valószínűsítjük [51].

A feszültség-kapuzott Na^+ csatornák élettani funkciója még nem teljesen ismert a limfocitákban. Előző tanulmányokban már utaltak a csatornák potenciális kanonikus funkciójára [37-39, 139]. Jurkat T sejteken a Na_v csatornák jelenléte a sejtmigrációhoz köthető, mivel Matrigel inváziós kamrát használva a TTX alkalmazása szignifikánsan csökkentette a migrációt [40]. Továbbá a $Na_v1.5$ szerepet játszik a $CD4^+$ T sejtek érési folyamatának pozitív szelekciójában, mert ezen ioncsatornák funkciójának és expressziójának gátlása a szelekciós folyamatokat szignifikánsan befolyásolta [41]. Azon Na_v izoformákról, melyek kísérleteinkben RT-qPCR-rel magas expressziót mutattak a B sejtekben, még nincs limfocitákat érintő funkcionális tanulmány.

Az immunsejtek sok hasonlóságot mutatnak az ioncsatorna profiljukban a sejt differenciáció során. Például a $K_v1.3$ csatorna, mely kifejeződik makrofágokban, dendritikus sejtekben, T sejtekben és B sejtekben is, expressziója megnő a sejtaktiváció során a legtöbb szubpopulációban [18, 145, 152, 153]. A K^+ csatornák működése, a membrán hiperpolarizációja és így az elektrokémiai hajtóerő fenntartása révén, fontos a sejtaktivációhoz szükséges Ca^{2+} beáramláshoz. Elképzelhető, hogy a $CD1a^+$ dendritikus sejtekhez hasonlóan, a B sejtekben is, a Na_v csatornák működése a membrán depolarizációja révén megakadályozza a szükségtelen sejtaktivációt. A Na_v csatornák alacsony, de jelenlévő nyugalmi aktivitása, valamint a K_v és K_{Ca} csatornák alacsony expressziója stabilizálhatja ezt a depolarizált állapotot, azonban egy kellően erős aktiváló inger hatására a csatornák expressziójában váltás következhet be a Na_v csökkentésével és a K_v csatornák emelésével, ami megteremtheti a kalcium jelátvitel feltételeit.

Figyelembe véve az alacsony átlagos I_{NaV} csúcsáramot ($-57,0 \pm 12,6$ pA), lehetséges, hogy ezen ioncsatornáknak nem-kanonikus funkciói is vannak a B sejtekben, melyeknek nincs köze az ionáramláshoz és a membránpotenciál-szabályozáshoz. Ilyen funkciókat írtak le a neurális $K_v2.1$ és 2.2 csatornáknál is, melyek csomópontot alkotva a sejtmembrán és az endoplazmatikus retikulum között, szerepet játszanak a membrán trafficking-ben, ahogy szabályozzák az exocitózist, endocitózist és lipid transzfert is [154, 155]. Hasonlóan, a $K_v1.3$ csatorna nem-kanonikus funkcióját írták le vaszkuláris simaizom sejtekben, melyekben a proliferációhoz a kapuzási mechanizmus működése elégséges volt a K^+ ionok áramlása nélkül [156]. Habár a nem-kanonikus funkciókat a tanulmányunk alapján nem tudjuk kizárni, a Na^+ -mentes oldat perfúziója során bekövetkezett erős hiperpolarizáció alapján a I_{NaV} csatornák kanonikus funkciója valószínűbb a B sejtek esetében.

6.2 $K_{Ca}1.1/\beta3$ komplexek funkcionálisan kifejeződnek a glioblasztóma sejtmembránban

A disszertáció alapjául szolgáló közleményben kimutattuk, hogy a $K_{Ca}1.1$ a domináns K^+ csatorna a glióma sejtmembránjában, mely expressziójának sejtciklus-függése van, de a hozzá asszociálódó $\beta3$ alegységnek nincs. Habár a $K_{Ca}1.1$ számos szövetben kifejeződik, a járulékos béta/gamma alegység expresszió függ a szöveti mintázattól. A $\beta3$ ritkábban fejeződik ki egészséges szövetben, és eddig csupán a herében, hasnyálmirigyben és lépben írták le kifejeződését fiziológias esetben. Így a $\beta3$ expresszió releváns lehet a különböző betegségek diagnosztikájában és terápiájában is. Például, a $\beta3$ fehérjét kódoló gén (KCNMB3) túlzott kifejeződése rosszabb prognózissal jár a GBM-es betegeknél [157], valamint emelkedett $\beta3$ expresszióról számoltak be fibroblaszt-szerű szinoviocitáknál (FLS), reumatoid arthritisz esetében is [158]. Továbbá a $\beta3$ alegységek funkcionális kifejeződése a GBM membránban, akár sejtfelszíni markerként is szolgálhat a jövőben, a magas grádusú gliómák esetében.

6.2.1 A $\beta3$ a domináns járulékos alegység

A $K_{Ca}1.1$ $\alpha/\beta3$ komplexek funkcionális kifejeződését a GBM sejtmembránban az alábbi pontok támasztják alá: (I) a KCNMB3 transzkript kifejeződött mind a GBM mind az U-87 MG sejtekben, és utóbbiakban magas kópiaszámot láttunk PCR-rel, hasonlóan a KCNMA1-hez (13. ábra A panel és 14. ábra); (II) a makroszkópos áram emelkedett $30 \mu M$ AA perfúzióra (12. ábra B

panel), és KCNMB3 csendesítésre ez az áramemelkedés szignifikánsan csökkent (13. ábra E panel); (III) Gyors és inkomplett inaktiváció jelentkezett 10 μ M szabad intracelluláris kalciumot alkalmazva +180 mV-on (16. ábra A-D panel); (IV) A farokáram megjelenése -100 mV-on 20 mM-os DTT kezelés során (16. ábra E és F panel); (V) Az ionáram szenzitivitása $\sim$ 20 nM IbTx-re konzisztens a $K_{Ca1.1}/\beta 3$ komplexre publikált értékekkel [135]. Ezen öt pont együttes jelenléte utal a $K_{Ca1.1}/\beta 3$ komplexek funkcionális kifejeződésére a GBM sejtmembránban. Mivel az eredményeink külön-külön más β alegységek kifejeződésénél is előfordulhatnak, ezért ezeknek az ismertetésével lentebb foglalkozunk.

A $\beta 1$ alegység, mely legfőképpen a simaizomban került leírásra, epesavak által aktiválhatóvá teszi az ioncsatornát [90, 127, 159]. A mi kísérletünkben 75 μ M LCA aktiválta ugyan az ioncsatornát a sejtvonal sejteinél (12. ábra A panel), de több adat is a kifejeződése ellen szól. Először is, qPCR-rel nem tudtunk KCNMB1 terméket detektálni sem a primer sejteknél sem az U-87 MG sejteknél (13. ábra A panel és 14. ábra). Ezen kívül WB-tal sem adott jelet a $\beta 1$ ellenes antitest, holott a kontroll CHO sejtekkel igazoltuk az antitest hatékonyságát (13. ábra B panel), valamint a KCNMB1 siRNS-sel való csendesítésével sem sikerült szignifikánsan változtatni az LCA hatást (13. ábra C panel). Annak a tudatában, hogy az epesavak más ioncsatornákon is hathatnak (például ismertek az epesav-szenzitív „BASIC” csatornák) [125], valószínűbb, hogy a litokólsav nem $K_{Ca1.1}$ -en keresztül növelte meg a csúcsáramot a tanulmányunkban. A $K_{Ca1.1}/\beta 1$ komplex továbbá meglehetősen rezisztens az IbTx-ra (publikált IC_{50} értékek 65-370 nM-ig terjednek [135, 160], ami ellentmond az általunk kapott MÁH értékeknek; 12. ábra D panel), ami tovább csökkenti a $\beta 1$ kifejeződésének valószínűségét. Végül a $\beta 1$ -hez asszociált $K_{Ca1.1}$ csatornáknak van farokárama negatív membránpotenciálon, amely szintén ellentmond a mi adatainknak (16. ábra E-F panel) [161].

A $\beta 2$ alegység a qPCR eredmények alapján kifejeződik mRNS szinten a glioblasztóma sejtekben (13. ábra A panel és 14. ábra), és WB-tal is adott jelet a $\beta 2$ -ellenes antitest, valamint KCNMB2 csendesítésre csökkenő tendenciát mutatott az AA áramnövelő hatása (12. ábra B és D panel). A fentiek alapján a $\beta 2$ kifejeződik a GBM membránjában, azonban a $\beta 2$ expresszió komplett inaktivációhoz vezet már alacsony citoszólikus Ca^{2+} -koncentrációnál és 100 mV-os depolarizációnál is [110, 162], melyet nem detektálunk a patch-clamp méréseink során (12. ábra C panel). A teljes inaktivációt még 10 μ M intracelluláris szabad kalcium esetében sem láttuk (16. ábra C panel). Ennek a komplett inaktivációnak a hiánya nem feltétlenül zárja ki a $\beta 2$

membránjelenlétét, mivel egy α alegységhez négy β asszociálódhat [163], így a különböző béta alegységek aránya befolyásolhatja az általunk detektált biofizikai paramétereket is. A sztöchiometriát a következőkben érdemes lesz figyelembe venni, hiszen több $\beta 2$ alegység (a gyors és komplett inaktiváció miatt) csökkent hajtóerőt jelent a kalcium influxra, míg több $\beta 3$ alegység kifejeződés (az inkomplett inaktiváció miatt) elnyújtott kalcium beáramlással járna.

A $\beta 4$ alegység a domináns a központi idegrendszerben [102, 103], így a glioblasztómában várható volt a kifejeződése. Transzfektált sejteknél a $\beta 4$ alegység rezisztenssé teszi a $K_{Ca1.1}$ csatornát az IbTx-re [134, 160], így a kapott adataink alapján a $\beta 4$ kifejeződése megkérdőjeleződik (12. ábra D panel). Ennek ellenére vannak publikációk, melyek szerint IbTx-szenzitív sejtek is kifejezhetik ezt az alegységet, melynek hátterében a változó sztöchiometria mellett a $\beta 4$ alegységek alacsony membránbeli expressziója állhat [161, 164], de ezekre még tényszerű adat nem áll rendelkezésünkre.

A gamma alegységek kifejeződése valószínűtlen a GBM membránjában, hiszen a $K_{Ca1.1}/\gamma$ komplexek már alacsony intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnál is nagyon negatív membránpotenciálokra nyitnak (akár -150 mV) [161], míg a GBM és U-87 MG $K_{Ca1.1}$ ioncsatornái pozitívabb tesztpotenciálokra kezdtek nyitni (11. ábra A panel).

A primer GBM és a sejtvonal U-87 MG ionáramai között két fő különbség merült fel:

- 1.) A sejtvonal sejtjei érzékenyek voltak 75 μM LCA-ra, míg a primer GBM sejtek nem. Ennek a hátterében a fentebb említett BASIC ioncsatornák kifejeződése állhat.
- 2.) A primer glioblasztóma sejtek kevésbé voltak érzékenyek 1 μM Pax és ~20 nM IbTx kezelésre, amely más, kifelé irányuló áramot adó ioncsatorna membránjelenlétét feltételezi. Ilyen csatorna lehet, az irodalomból ismert ClC-3 csatorna, mely kísérletes elrendezésünkben pozitív áramot adhat, vagy a lassan inaktiválódó K_V ioncsatornák (pl. $K_V1.2$ vagy $K_V1.5$).

Habár előfordultak különbségek a primer sejtek és a sejtvonal között, ez a fő konklúziót nem befolyásolja, miszerint az adataink a $K_{Ca1.1}/\beta 3$ komplexek domináns kifejeződését támasztják alá glioblasztómában, amellet, hogy $\beta 2$ alegységek is előfordulhatnak alacsonyabb számban.

6.2.2 A $K_{Ca1.1}$ expresszió sejtciklus-függése

Mint ismert, egyes ioncsatornák expressziója változik a sejtciklus során. A K^+ csatornáknak nagy szerepe van a sejtciklus progresszióban a membránpotenciál szabályozása révén, hiszen a K^+ permeabilitás változása (a K^+ negatív Nernst potenciálja miatt), emelkedés (azaz csatornanyitás) esetén hiperpolarizálja, csökkenés esetén pedig depolarizálja a membránt [138]. Általánosan, a G1/S fázis határán magas K^+ csatorna aktivitást írtak le, míg G2/M fázisban a káliumcsatornák alacsony membránaktivitása figyelhető meg. Ezzel párhuzamban a Nav csatornák expressziója az M fázisban emelkedett. Egy korábbi tanulmányban humán mezenchimális őssejtek $K_{Ca1.1}$ ioncsatornáinak sejtciklus-függését vizsgálták [165], és adataik alapján a $K_{Ca1.1}$ pozitív sejtek aránya csökkent volt a G2/M fázisban az éheztetéssel G_0 fázisba szinkronizált populációhoz képest. Ezzel ellentmondanak a mi adataink, mivel a kolhicinnel kezelt (M fázis dúsított) U-87 MG populációnál a csúcsáram és az áramsűrűség is szignifikánsan nagyobb volt a szinkronizálatlan populációhoz képest, valamint ez az áramemelkedés Pax szenzitív áramnak bizonyult (17. ábra C-E panel). Hasonlóan a mi adatainkhoz, megtermékenyítetlen egér oocitában található magas konduktanciájú K^+ csatorna - mely a Ca^{2+} -érzékenység és charybdotoxin - inszenzitívitás alapján nem biztos, hogy $K_{Ca1.1}$ - aktivitása szintén magasabb volt az M fázisban [166].

Hogy miért fontosak a káliumcsatornák a sejtciklus progresszióban, arra több magyarázat is felmerült. Először is, a mitózishoz a sejt volumen (így a nyomás) tranziens csökkenése szükséges, melyben a kifelé irányuló káliumáramot adó ioncsatornák szerepet játszanak [167, 168]. Leírták, hogy a medulloblasztóma sejtekben a $K_v10.2$ csatorna szerepet játszik a sejtosztódáshoz szükséges sejttérfogat csökkentésben [169]. A sejtméret-proliferáció összefüggését glióma sejteken is nézték, ahol ioncsatornák gátlásával és a tenyésztő médium ozmolaritásának (így a sejt volumen) változtatásával a proliferációs ráta is változott, úgy, hogy a sejtméret-osztódás görbéje harang alakot vett fel [170, 171]. Egy magyarázat a haranggörbe kialakulására, a makromolekuláris tömörülés elmélet, ami szerint a sejtciklus szabályozásához szükséges makromolekulák konformációja és aktivitása függ a hidratáltsági állapotuktól [167]. A modell alapján a molekulák aktivitása Boltzmann eloszlást követ, és mivel ez az aktivitás jelenthet proliferációs ráta növekedést és csökkenést is, így szükségszerűen kialakul egy térfogat intervallum, ahol a sejtosztódás optimális.

Ezen kívül a K^+ csatornáknak fontos szerepük van a kalciumjel kialakításban, a hajtóerő biztosításával [172-174]. Így egyes káliumcsatornák specifikus gátlásával sejtciklus blokáddá válhat, ami csökkent proliferációhoz vezet. Ezen ioncsatornák közé tartozik a $K_v1.3$ [175], $K_v10.1$ [176], $K_v11.1$ [177] és a $K_{Ca}3.1$ [178] is. Továbbá azt találták, hogy a K^+ konduktancia nem is mindig szükséges a sejtciklus progresszióhoz, a káliumcsatornák nem-kanonikus funkcióit feltételezve. Ilyen nem-kanonikus funkciót találtak a *Drosophila* EAG csatornánál, ami a humán $K_v10.1$ ortológja [179]. A csatorna pórusában egy aminosavat elmutálva létrehoztak egy nem-konduktív ioncsatornát, melynek expressziója a vad típusú EAG csatornához hasonló módon növelte a proliferációs rátát. Ez a p38 MAP kináz útvonalon keresztül történhet, amely felelős többek között a gyulladásos, proliferációs és apoptotikus válaszok kialakulásában [180]. A foszforilált (aktivált) p38 szintje szignifikánsan magasabb volt a mutált EAG-t expresszáló sejteknél a kontroll (nem-expresszáló) sejtekhez képest, valamint az előbbi sejtek proliferációs rátája, a p38 MAP kináz gátlásával, lecsökkent az utóbbiak szintjére. Így, mint a *Drosophila* EAG csatornának, a többi K^+ csatornának is lehet nem-kanonikus szerepe a sejtciklus szabályozásban. A fenti szerepek közül, a glioblasztóma $K_{Ca}1.1$ -nek ismert az ozmoregulációs szerepe, így ez is magyarázhatja az M fázisban látott magasabb $K_{Ca}1.1$ áramot.

Farmakológiai eredményeink alapján, az alfa alegységgel ellentétben, a béta alegység expressziója nem változott a sejtciklus függvényében, mivel 30 μM AA áramnövelő hatása nem tért el szignifikánsan a szinkronizált és a szinkronizálatlan populációk között. Mivel a $\beta 3$ ugyanúgy jelen van az M fázisban, ezért a glioblasztóma $K_{Ca}1.1$ csatornák béta alegység-függő, szövetspecifikus gátlása potenciális terápia lehetne a jövőben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Disszertációmban a feszültség-kapuzott kationcsatornák membrán-expresszióját vizsgáltam fiziológiás és patológiás állapotokban. A fiziológiás állapotot az egészséges, krónikus betegségben nem szenvedő alanyok B sejtjei, míg a patológiás állapotot GBM-es betegek mintái és az U-87 MG sejtvonal adták.

A B sejteken elsőként térképeztük fel a feszültség-kapuzott nátriumcsatornákat. Molekuláris biológiai és elektrofiziológiai adataink alapján TTX-szenzitív és rezisztens Nav csatornák egyszerre vannak jelen és funkcionálnak a B sejtek membránjában. Eredményeink alapján e csatornák kanonikus funkciója a valószínű, azaz a nyugalmi membránpotenciál kialakításában és szabályozásában játszanak szerepet. Mivel még mindig keveset tudunk a nátriumcsatornák szerepéről az immunsejtek működésében, ezért a Nav csatornák funkcionális jelenlétét érdemes lehet a jövőben megfontolni ezen sejtek farmakológiai és funkcionális vizsgálata során. Tovább vizsgálva, hogy a B sejtek milyen alpopulációin jelenik meg a Nav csatorna, megalapozhatja az immunfunkciók szelektív farmakológiai modulálását.

A glioblasztóma sejteken azt találtuk, hogy a $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ ioncsatorna funkcionális komplexeket alkot a $\beta 3$ alegységgel a sejtmembránban. A GBM sejtek $\beta 3$ expressziója a jövőben kemoterápiás célpont lehet, hiszen a központi idegrendszerben leginkább a $\beta 4$ alegység fejeződik ki, így a $\text{K}_{\text{Ca}}1.1/\beta 3$ komplexek gátlása szövetspecifikus lenne a glioblasztómára. A $\beta 3$ expresszióját a malignus glioblasztóma sejtek markereként is alkalmazhatnák a jövőben, mely nem csak a terápiában, de a diagnosztikában is segítséget nyújtana.

8. SUMMARY

In my dissertation, I investigated the membrane expression of voltage-gated cation channels in physiological and pathological conditions. The physiological condition was represented by B cells from healthy subjects without chronic disease, while the pathological condition was represented by samples from GBM patients and the U-87 MG cell line.

We were the first to characterize the functional expression of voltage-gated sodium channels in B cells. The molecular biology and electrophysiology data suggest that TTX-sensitive and resistant Nav channels are simultaneously present and functional in the B cell membrane. Based on our study, these channels perform their canonical function, generating and regulating the resting membrane potential. Since little is still known about the role of sodium channels in immune cell function, the functional presence of Nav channels may be worth considering in future pharmacological and functional studies of these cells. Further investigation of the subpopulations of B cells, in which Nav channels are expressed may provide a basis for selective pharmacological modulation of immune functions.

In glioblastoma cells, we found that the K_{Ca}1.1 ion channel forms functional complexes with the β 3 subunit in the cell membrane. The expression of β 3 in GBM cells could be a future chemotherapeutic target, as in the central nervous system the β 4 subunit dominates, so inhibition of the K_{Ca}1.1/ β 3 complexes would be tissue specific for glioblastoma. Also, this expression could be a marker for malignant glioblastoma cells in the future, which would not only aid in therapy but also in diagnostics.

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Prof. Dr. Varga Zoltánnak, aki mind orvosi tanulmányaim, mind PhD képzésem során mentorom volt, és ajtaja mindig nyitva volt a számomra. Köszönettel tartozok Dr. Pethő Zoltánnak, aki témavezetőm volt a TDK-s éveim alatt, és nagyon sokat segített a tudományos munkám kezdetén, valamint továbbra is lelkes kollaborátora a munkacsoportunknak.

Szintén őszintén nagyra értékelem Prof. Dr. Panyi Györgynek, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának óriási segítségét, aki elsőéves orvostanhallgatóként meghívott a munkacsoportba, és az elmúlt tíz év alatt felbecsülhetetlen értékű betekintést nyújtott a tudományos életbe.

Köszönetet kell mondanom laboratóriumunk korábbi és jelenlegi tagjainak: Dr. Szántó G. Tibornak, Dr. Tajti Gábornak, Dr. Papp Ferencnek, Dr. Hajdu Péternek, Dr. Vörös Orsolyának, Csóti Ágotának, Dr. Naseem Muhammad Umairnek, Dr. Borrego Terrazas Jesus Ángelnek, Dr. Korpos-Pintye-Gyuri Évának és Dr. Arnódi-Mészáros Beátának, akik nem csak segítettek szakmai munkám során, hanem remek légkört is biztosítottak a munkához. Nagyra értékelem továbbá laboratóriumi technikusaink, Nagy Cecília és Bagosi Adrienn folyamatos segítségét is.

10. TÁRGYSZAVAK

Limfocita

B sejt

Feszültség-kapuzott kationcsatorna

Nav csatorna

Glioblasztóma

K_{Ca}1.1 csatorna

Járulékos alegység

Patch-clamp elektrofiziológia

KEYWORDS

Lymphocyte

B cell

Voltage-gated cation channel

Nav channel

Glioblastoma

K_{Ca}1.1 channel

Auxiliary subunit

Patch-clamp electrophysiology

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hille, B., *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. 1992, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. xiii, 607 p.
2. Armstrong, C.M. and B. Hille, *Voltage-gated ion channels and electrical excitability*. *Neuron*, 1998. **20**(3): p. 371-80.
3. Jentsch, T.J., C.A. Hubner, and J.C. Fuhrmann, *Ion channels: function unravelled by dysfunction*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(11): p. 1039-47.
4. Kim, J.B., *Channelopathies*. *Korean J Pediatr*, 2014. **57**(1): p. 1-18.
5. Kunzelmann, K., *Ion channels and cancer*. *J Membr Biol*, 2005. **205**(3): p. 159-73.
6. RamaKrishnan, A.M. and K. Sankaranarayanan, *Understanding autoimmunity: The ion channel perspective*. *Autoimmun Rev*, 2016. **15**(7): p. 585-620.
7. Rosa, P., et al., *Overexpression of Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Human Glioblastoma Stem-Like Cells and Their Role in Cell Migration*. *J Cell Physiol*, 2017. **232**(9): p. 2478-2488.
8. McFerrin, M.B. and H. Sontheimer, *A role for ion channels in glioma cell invasion*. *Neuron Glia Biol*, 2006. **2**(1): p. 39-49.
9. Steinle, M., et al., *Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 122-6.
10. Orfali, R. and N. Albanyan, *Ca(2+)-Sensitive Potassium Channels*. *Molecules*, 2023. **28**(2).
11. Lund, F.E., *Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(3): p. 332-8.
12. Lund, F.E., et al., *Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease*. *Curr Dir Autoimmun*, 2005. **8**: p. 25-54.
13. Shen, P. and S. Fillatreau, *Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(7): p. 441-51.
14. Feske, S., E.Y. Skolnik, and M. Prakriya, *Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(7): p. 532-47.
15. Mahtani, T. and B. Treanor, *Beyond the CRAC: Diversification of ion signaling in B cells*. *Immunol Rev*, 2019. **291**(1): p. 104-122.
16. Stokes, L., A.B. MacKenzie, and R. Sluyter, *Editorial: Roles of Ion Channels in Immune Cells*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 48.
17. Zheng, H., et al., *Identification of the large-conductance background K⁺ channel in mouse B cells as TREK-2*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(1): p. C188-97.
18. Wulff, H., et al., *K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 776-86.
19. MacDougall, S.L., S. Grinstein, and E.W. Gelfand, *Activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in human B lymphocytes by anti-immunoglobulin*. *J Clin Invest*, 1988. **81**(2): p. 449-54.
20. Ransom, J.T. and J.C. Cambier, *The dynamics and relationship of K⁺ efflux and Ca⁺⁺ influx in B lymphocytes after antigen-receptor cross-linking*. *Soc Gen Physiol Ser*, 1988. **43**: p. 241-51.
21. Zhang, S., et al., *Blockage of K(Ca)3.1 and Kv1.3 channels of the B lymphocyte decreases the inflammatory monocyte chemotaxis*. *Int Immunopharmacol*, 2016. **31**: p. 266-71.
22. Davenport, B., et al., *Signature Channels of Excitability no More: L-Type Channels in Immune Cells*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 375.
23. Grafton, G., et al., *A non-voltage-gated calcium channel with L-type characteristics activated by B cell receptor ligation*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(10): p. 2001-9.

24. Kotturi, M.F. and W.A. Jefferies, *Molecular characterization of L-type calcium channel splice variants expressed in human T lymphocytes*. Mol Immunol, 2005. **42**(12): p. 1461-74.
25. Sadighi Akha, A.A., et al., *Anti-Ig-induced calcium influx in rat B lymphocytes mediated by cGMP through a dihydropyridine-sensitive channel*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7297-300.
26. Stokes, L., J. Gordon, and G. Grafton, *Non-voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in human T cells: pharmacology and molecular characterization of the major alpha pore-forming and auxiliary beta-subunits*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19566-73.
27. Feske, S., et al., *Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 316-24.
28. Hogan, P.G., R.S. Lewis, and A. Rao, *Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 491-533.
29. Hoth, M. and R. Penner, *Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells*. Nature, 1992. **355**(6358): p. 353-6.
30. Limnander, A., et al., *STIM1, PKC-delta and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 425-33.
31. Matsumoto, M., et al., *The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 703-14.
32. Zweifach, A. and R.S. Lewis, *Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6295-9.
33. Pippel, A., et al., *Inhibition of antigen receptor-dependent Ca(2+) signals and NF-AT activation by P2X7 receptors in human B lymphocytes*. Cell Calcium, 2015. **57**(4): p. 275-89.
34. Bradford, A.L., et al., *Immunopurification and functional reconstitution of a Na⁺ channel complex from rat lymphocytes*. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 1): p. C601-11.
35. Launay, P., et al., *TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1374-7.
36. Lai, Z.F., et al., *An amiloride-sensitive and voltage-dependent Na⁺ channel in an HLA-DR-restricted human T cell clone*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 83-90.
37. Gaspar, R., Jr., et al., *Bretylium-induced voltage-gated sodium current in human lymphocytes*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1137**(2): p. 143-7.
38. Pieri, C., et al., *Ligand and voltage gated sodium channels may regulate electrogenic pump activity in human, mouse and rat lymphocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **160**(3): p. 999-1002.
39. Roselli, F., P. Livrea, and E. Jirillo, *Voltage-gated sodium channel blockers as immunomodulators*. Recent Pat CNS Drug Discov, 2006. **1**(1): p. 83-91.
40. Fraser, S.P., et al., *T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 191-4.
41. Lo, W.L., D.L. Donermeyer, and P.M. Allen, *A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells*. Nat Immunol, 2012. **13**(9): p. 880-7.
42. Catterall, W.A., A.L. Goldin, and S.G. Waxman, *International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 397-409.
43. Goldin, A.L., et al., *Nomenclature of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 365-8.
44. Zhang, Y., et al., *Left ventricular systolic dyssynchrony is a predictor of cardiac remodeling after myocardial infarction*. Am Heart J, 2008. **156**(6): p. 1124-32.
45. Black, J.A., et al., *Glial cells have heart: rH1 Na⁺ channel mRNA and protein in spinal cord astrocytes*. Glia, 1998. **23**(3): p. 200-8.

46. Black, J.A., et al., *Isoform-specific expression of sodium channels in astrocytes in vitro: immunocytochemical observations*. *Glia*, 1995. **14**(2): p. 133-44.
47. Reese, K.A. and J.H. Caldwell, *Immunocytochemical localization of NaCh6 in cultured spinal cord astrocytes*. *Glia*, 1999. **26**(1): p. 92-6.
48. Sontheimer, H., et al., *Astrocyte Na⁺ channels are required for maintenance of Na⁺/K⁺-ATPase activity*. *J Neurosci*, 1994. **14**(5 Pt 1): p. 2464-75.
49. Donatsch, P., et al., *The functional significance of sodium channels in pancreatic beta-cell membranes*. *J Physiol*, 1977. **267**(2): p. 357-76.
50. Zhao, P., et al., *Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain*. *Pain*, 2008. **139**(1): p. 90-105.
51. Kis-Toth, K., et al., *Voltage-gated sodium channel Nav1.7 maintains the membrane potential and regulates the activation and chemokine-induced migration of a monocyte-derived dendritic cell subset*. *J Immunol*, 2011. **187**(3): p. 1273-80.
52. Black, J.A., S. Liu, and S.G. Waxman, *Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia*. *Glia*, 2009. **57**(10): p. 1072-81.
53. Carrithers, M.D., et al., *Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(12): p. 8114-26.
54. Hoffman, J.F., et al., *Tetrodotoxin-sensitive Na⁺ channels and muscarinic and purinergic receptors identified in human erythroid progenitor cells and red blood cell ghosts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(33): p. 12370-4.
55. Poffers, M., et al., *Sodium Channel Nav1.3 Is Expressed by Polymorphonuclear Neutrophils during Mouse Heart and Kidney Ischemia In Vivo and Regulates Adhesion, Transmigration, and Chemotaxis of Human and Mouse Neutrophils In Vitro*. *Anesthesiology*, 2018. **128**(6): p. 1151-1166.
56. Angus, M. and P. Ruben, *Voltage gated sodium channels in cancer and their potential mechanisms of action*. *Channels (Austin)*, 2019. **13**(1): p. 400-409.
57. Paez, P.M., et al., *Voltage-operated Ca²⁺ and Na⁺ channels in the oligodendrocyte lineage*. *J Neurosci Res*, 2009. **87**(15): p. 3259-66.
58. Varga, Z., et al., *Switch of voltage-gated K⁺ channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca²⁺-oscillations and cartilage formation*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27957.
59. Zsiros, E., et al., *Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells*. *J Immunol*, 2009. **183**(7): p. 4483-92.
60. de Lera Ruiz, M. and R.L. Kraus, *Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications*. *J Med Chem*, 2015. **58**(18): p. 7093-118.
61. Bendahhou, S., A.O. O'Reilly, and H. Duclohier, *Role of hydrophobic residues in the voltage sensors of the voltage-gated sodium channel*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(6): p. 1440-7.
62. Keynes, R.D. and F. Elinder, *Modelling the activation, opening, inactivation and reopening of the voltage-gated sodium channel*. *Proc Biol Sci*, 1998. **265**(1393): p. 263-70.
63. Dudev, T. and C. Lim, *Ion selectivity strategies of sodium channel selectivity filters*. *Acc Chem Res*, 2014. **47**(12): p. 3580-7.
64. Vilin, Y.Y., C.H. Peters, and P.C. Ruben, *Acidosis differentially modulates inactivation in na(v)1.2, na(v)1.4, and na(v)1.5 channels*. *Front Pharmacol*, 2012. **3**: p. 109.
65. Lin, Z., et al., *Biophysical and Pharmacological Characterization of Nav1.9 Voltage Dependent Sodium Channels Stably Expressed in HEK-293 Cells*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0161450.
66. Wang, D.W., A.L. George, Jr., and P.B. Bennett, *Comparison of heterologously expressed human cardiac and skeletal muscle sodium channels*. *Biophys J*, 1996. **70**(1): p. 238-45.

67. McNulty, M.M. and D.A. Hanck, *State-dependent mibefradil block of Na⁺ channels*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(6): p. 1652-61.
68. Liu, C.J., et al., *Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 1029-36.
69. Makielski, J.C., et al., *A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels*. Circ Res, 2003. **93**(9): p. 821-8.
70. van Bemmelen, M.X., et al., *Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 284-91.
71. Herzog, R.I., et al., *Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons*. J Physiol, 2003. **551**(Pt 3): p. 741-50.
72. Ohtubo, Y., *Slow recovery from the inactivation of voltage-gated sodium channel Nav1.3 in mouse taste receptor cells*. Pflugers Arch, 2021. **473**(6): p. 953-968.
73. Lee, C.H. and P.C. Ruben, *Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin*. Channels (Austin), 2008. **2**(6): p. 407-12.
74. Rosker, C., et al., *The TTX metabolite 4,9-anhydro-TTX is a highly specific blocker of the Na(v1.6) voltage-dependent sodium channel*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(2): p. C783-9.
75. Lewis, R.J., et al., *Conus venom peptide pharmacology*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(2): p. 259-98.
76. Schmalhofer, W.A., et al., *ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(5): p. 1476-84.
77. Hoda, S.A. and E. Cheng, *Robbins Basic Pathology*. Am J Clin Pathol, 2017.
78. Fan, Q.W. and W.A. Weiss, *Inhibition of PI3K-Akt-mTOR signaling in glioblastoma by mTORC1/2 inhibitors*. Methods Mol Biol, 2012. **821**: p. 349-59.
79. Allen, M., et al., *Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news*. Sci Transl Med, 2016. **8**(354): p. 354re3.
80. Burzynski, S.R., et al., *Long-term survival and complete response of a patient with recurrent diffuse intrinsic brain stem glioblastoma multiforme*. Integr Cancer Ther, 2004. **3**(3): p. 257-61.
81. Tan, A.C., et al., *Management of glioblastoma: State of the art and future directions*. CA Cancer J Clin, 2020. **70**(4): p. 299-312.
82. Liu, X., et al., *Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1840-9.
83. Ransom, C.B., X. Liu, and H. Sontheimer, *BK channels in human glioma cells have enhanced calcium sensitivity*. Glia, 2002. **38**(4): p. 281-91.
84. Joshi, A.D., et al., *Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 17.
85. Wang, B., et al., *Suppression of CLC-3 chloride channel reduces the aggressiveness of glioma through inhibiting nuclear factor-kappaB pathway*. Oncotarget, 2017. **8**(38): p. 63788-63798.
86. McVicker, D.P., M.M. Millette, and E.W. Dent, *Signaling to the microtubule cytoskeleton: an unconventional role for CaMKII*. Dev Neurobiol, 2015. **75**(4): p. 423-34.
87. Cuddapah, V.A. and H. Sontheimer, *Molecular interaction and functional regulation of CLC-3 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11188-96.
88. Rosa, P., et al., *BK channels blockage inhibits hypoxia-induced migration and chemoresistance to cisplatin in human glioblastoma cells*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6866-6877.
89. Sun, X.P., L.C. Schlichter, and E.F. Stanley, *Single-channel properties of BK-type calcium-activated potassium channels at a cholinergic presynaptic nerve terminal*. J Physiol, 1999. **518** (Pt 3): p. 639-51.

90. Li, Q. and J. Yan, *Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits*. Int Rev Neurobiol, 2016. **128**: p. 51-90.
91. Ghatta, S., et al., *Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications*. Pharmacol Ther, 2006. **110**(1): p. 103-16.
92. Raisch, T., et al., *Small molecule modulation of the Drosophila Slo channel elucidated by cryo-EM*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 7164.
93. Qi, Z., et al., *Activation of a mechanosensitive BK channel by membrane stress created with amphipaths*. Mol Membr Biol, 2005. **22**(6): p. 519-27.
94. Meera, P., et al., *Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 14066-71.
95. Liu, G., et al., *Position and role of the BK channel alpha subunit S0 helix inferred from disulfide crosslinking*. J Gen Physiol, 2008. **131**(6): p. 537-48.
96. Liu, G., et al., *Positions of the cytoplasmic end of BK alpha S0 helix relative to S1-S6 and of beta1 TM1 and TM2 relative to S0-S6*. J Gen Physiol, 2015. **145**(3): p. 185-99.
97. Schreiber, M. and L. Salkoff, *A novel calcium-sensing domain in the BK channel*. Biophys J, 1997. **73**(3): p. 1355-63.
98. Shi, J., et al., *Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels*. Nature, 2002. **418**(6900): p. 876-80.
99. Xia, X.M., X. Zeng, and C.J. Lingle, *Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels*. Nature, 2002. **418**(6900): p. 880-4.
100. Ma, Z., X.J. Lou, and F.T. Horrigan, *Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels*. J Gen Physiol, 2006. **127**(3): p. 309-28.
101. Knaus, H.G., et al., *Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels*. J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 3921-4.
102. Brenner, R., et al., *Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6453-61.
103. Behrens, R., et al., *hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family*. FEBS Lett, 2000. **474**(1): p. 99-106.
104. Zeng, X.H., X.M. Xia, and C.J. Lingle, *Redox-sensitive extracellular gates formed by auxiliary beta subunits of calcium-activated potassium channels*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(6): p. 448-54.
105. Garcia-Calvo, M., et al., *Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle*. J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 676-82.
106. Grimm, P.R., et al., *Hypertension of Kcnmb1^{-/-} is linked to deficient K secretion and aldosteronism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11800-5.
107. Wallner, M., et al., *Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium*. Recept Channels, 1995. **3**(3): p. 185-99.
108. Uebele, V.N., et al., *Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23211-8.
109. Pongs, O. and J.R. Schwarz, *Ancillary subunits associated with voltage-dependent K⁺ channels*. Physiol Rev, 2010. **90**(2): p. 755-96.
110. Wallner, M., P. Meera, and L. Toro, *Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 4137-42.

111. Hu, S., et al., *Variants of the KCNMB3 regulatory subunit of maxi BK channels affect channel inactivation*. *Physiol Genomics*, 2003. **15**(3): p. 191-8.
112. Xia, X.M., et al., *Rectification and rapid activation at low Ca^{2+} of Ca^{2+} -activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit*. *J Neurosci*, 2000. **20**(13): p. 4890-903.
113. Yan, J. and R.W. Aldrich, *BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(20): p. 7917-22.
114. Gessner, G., et al., *BKCa channels activating at resting potential without calcium in LNCaP prostate cancer cells*. *J Membr Biol*, 2005. **208**(3): p. 229-40.
115. Vetri, F., et al., *BK channels as physiological regulators: a focused review*. *Journal of Receptor Ligand and Channel Research*, 2014. **7**: p. 3-13.
116. Hill, M.A., et al., *Large conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(10): p. 2033-42.
117. Holtzclaw, J.D., P.R. Grimm, and S.C. Sansom, *Role of BK channels in hypertension and potassium secretion*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011. **20**(5): p. 512-7.
118. Meredith, A.L., et al., *Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(35): p. 36746-52.
119. Pluznick, J.L., et al., *Renal fluid and electrolyte handling in BKCa-beta1-/- mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(6): p. F1274-9.
120. Gu, N., K. Vervaeke, and J.F. Storm, *BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells*. *J Physiol*, 2007. **580**(Pt.3): p. 859-82.
121. Griguoli, M., M. Sgritta, and E. Cherubini, *Presynaptic BK channels control transmitter release: physiological relevance and potential therapeutic implications*. *J Physiol*, 2016. **594**(13): p. 3489-500.
122. N'Gouemo, P., *BKCa channel dysfunction in neurological diseases*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 373.
123. Torres, Y.P., S.T. Granados, and R. Latorre, *Pharmacological consequences of the coexpression of BK channel alpha and auxiliary beta subunits*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 383.
124. Tang, Q.-Y., et al., *Block of mouse Slo1 and Slo3 K^{+} channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine*. *Channels (Austin)*, 2010. **4**(1): p. 22-41.
125. Wiemuth, D., M. Assmann, and S. Grunder, *The bile acid-sensitive ion channel (BASIC), the ignored cousin of ASICs and ENaC*. *Channels (Austin)*, 2014. **8**(1): p. 29-34.
126. Bukiya, A.N., et al., *Beta1 (KCNMB1) subunits mediate lithocholate activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and dilation in small, resistance-size arteries*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**(2): p. 359-69.
127. Bukiya, A.N., et al., *The second transmembrane domain of the large conductance, voltage- and calcium-gated potassium channel beta(1) subunit is a lithocholate sensor*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(5): p. 673-8.
128. Wang, B., et al., *Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets*. *Signal Transduct Target Ther*, 2021. **6**(1): p. 94.
129. Bendahhou, S., T.R. Cummins, and W.S. Agnew, *Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(2 Pt 1): p. C592-600.
130. Kawanabe, A. and Y. Okamura, *Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells*. *J Physiol*, 2016. **594**(3): p. 595-610.
131. Meves, H., *Arachidonic acid and ion channels: an update*. *Br J Pharmacol*, 2008. **155**(1): p. 4-16.

132. Sun, X., et al., *Beta-subunit-dependent modulation of hSlo BK current by arachidonic acid*. J Neurophysiol, 2007. **97**(1): p. 62-9.
133. Martin, P., et al., *Arachidonic acid activation of BKCa (Slo1) channels associated to the beta1-subunit in human vascular smooth muscle cells*. Pflugers Arch, 2014. **466**(9): p. 1779-92.
134. Candia, S., M.L. Garcia, and R. Latorre, *Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K+ channel*. Biophys J, 1992. **63**(2): p. 583-90.
135. Lippiat, J.D., et al., *Properties of BK(Ca) channels formed by bicistronic expression of hSloalpha and beta1-4 subunits in HEK293 cells*. J Membr Biol, 2003. **192**(2): p. 141-8.
136. Gan, G., et al., *Structural basis for toxin resistance of beta4-associated calcium-activated potassium (BK) channels*. J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 24177-84.
137. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. J Gen Physiol, 2014. **144**(5): p. 415-40.
138. Urrego, D., et al., *Potassium channels in cell cycle and cell proliferation*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1638): p. 20130094.
139. Cahalan, M.D., et al., *A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes*. J Physiol, 1985. **358**: p. 197-237.
140. Bendahhou, S., et al., *Activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel: role of segment S5 revealed by a novel hyperkalaemic periodic paralysis mutation*. J Neurosci, 1999. **19**(12): p. 4762-71.
141. Cummins, T.R., et al., *Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(16): p. 5952-61.
142. Zhou, X., et al., *Electrophysiological and Pharmacological Analyses of Nav1.9 Voltage-Gated Sodium Channel by Establishing a Heterologous Expression System*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 852.
143. Zhu, W., et al., *Mechanisms of noncovalent beta subunit regulation of NaV channel gating*. J Gen Physiol, 2017. **149**(8): p. 813-831.
144. Tsukamoto, T., et al., *Differential binding of tetrodotoxin and its derivatives to voltage-sensitive sodium channel subtypes (Nav 1.1 to Nav 1.7)*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(21): p. 3881-3892.
145. Vanoye, C.G., et al., *Mechanism of sodium channel Nav1.9 potentiation by G-protein signaling*. J Gen Physiol, 2013. **141**(2): p. 193-202.
146. Beeton, C., et al., *Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17414-9.
147. Macfarlane, S.N. and H. Sontheimer, *Spinal cord astrocytes display a switch from TTX-sensitive to TTX-resistant sodium currents after injury-induced gliosis in vitro*. J Neurophysiol, 1998. **79**(4): p. 2222-6.
148. Rink, T.J., et al., *Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes*. Biochim Biophys Acta, 1980. **595**(1): p. 15-30.
149. Wilson, H.A. and T.M. Chused, *Lymphocyte membrane potential and Ca2+-sensitive potassium channels described by oxonol dye fluorescence measurements*. J Cell Physiol, 1985. **125**(1): p. 72-81.
150. Malofiejew, M., A. Kostrzevska, and E. Kowal, *[Electrical potential of blood lymphocytes]*. Acta Haematol Pol, 1975. **6**(2): p. 97-104.
151. Taki, M., *Studies on blastogenesis of human lymphocytes by phytohemagglutinin, with special reference to changes of membrane potential during blastoid transformation*. Mie Med J, 1970. **19**(3): p. 245-62.
152. Fordyce, C.B., et al., *Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(31): p. 7139-49.

153. Mullen, K.M., et al., *Potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 are expressed on blood-derived dendritic cells in the central nervous system*. Ann Neurol, 2006. **60**(1): p. 118-27.
154. Johnson, B., et al., *Kv2 potassium channels form endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions via interaction with VAPA and VAPB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(31): p. E7331-E7340.
155. King, A.N., C.F. Manning, and J.S. Trimmer, *A unique ion channel clustering domain on the axon initial segment of mammalian neurons*. J Comp Neurol, 2014. **522**(11): p. 2594-608.
156. Ciudad, P., et al., *Kv1.3 channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(5): p. 1299-307.
157. Ge, L., et al., *Big Potassium (BK) ion channels in biology, disease and possible targets for cancer immunotherapy*. Int Immunopharmacol, 2014. **22**(2): p. 427-43.
158. Petho, Z., et al., *Erratum to: Different expression of beta subunits of the KCa1.1 channel by invasive and non-invasive human fibroblast-like synoviocytes*. Arthritis Res Ther, 2016. **18**(1): p. 122.
159. Dopico, A.M., J.V. Walsh, Jr., and J.J. Singer, *Natural bile acids and synthetic analogues modulate large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channel activity in smooth muscle cells*. J Gen Physiol, 2002. **119**(3): p. 251-73.
160. Meera, P., M. Wallner, and L. Toro, *A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5562-7.
161. Gonzalez-Perez, V. and C.J. Lingle, *Regulation of BK Channels by Beta and Gamma Subunits*. Annu Rev Physiol, 2019. **81**: p. 113-137.
162. Ding, J.P. and C.J. Lingle, *Steady-state and closed-state inactivation properties of inactivating BK channels*. Biophys J, 2002. **82**(5): p. 2448-65.
163. Wang, Y.W., et al., *Consequences of the stoichiometry of Slo1 alpha and auxiliary beta subunits on functional properties of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1550-61.
164. Wang, B., D.B. Jaffe, and R. Brenner, *Current understanding of iberiotoxin-resistant BK channels in the nervous system*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 382.
165. Chubinskiy-Nadezhdin, V.I., et al., *Cell Cycle-Dependent Expression of Bk Channels in Human Mesenchymal Endometrial Stem Cells*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 4595.
166. Day, M.L., et al., *Cell-cycle control of a large-conductance K⁺ channel in mouse early embryos*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 560-2.
167. Dubois, J.M. and B. Rouzaire-Dubois, *The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation*. Eur Biophys J, 2004. **33**(3): p. 227-32.
168. Rouzaire-Dubois, B. and J.M. Dubois, *A quantitative analysis of the role of K⁺ channels in mitogenesis of neuroblastoma cells*. Cell Signal, 1991. **3**(4): p. 333-9.
169. Huang, X., et al., *Voltage-gated potassium channel EAG2 controls mitotic entry and tumor growth in medulloblastoma via regulating cell volume dynamics*. Genes Dev, 2012. **26**(16): p. 1780-96.
170. Rouzaire-Dubois, B., et al., *Cell size-proliferation relationship in rat glioma cells*. Glia, 2004. **45**(3): p. 249-57.
171. Rouzaire-Dubois, B., et al., *Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells*. Pflugers Arch, 2000. **440**(6): p. 881-8.
172. Lee, Y.S., M.M. Sayeed, and R.D. Wurster, *Inhibition of cell growth by K⁺ channel modulators is due to interference with agonist-induced Ca²⁺ release*. Cell Signal, 1993. **5**(6): p. 803-9.
173. Lepple-Wienhues, A., et al., *K⁺ channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation*. J Membr Biol, 1996. **151**(2): p. 149-57.

174. Lin, C.S., et al., *Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation*. J Exp Med, 1993. **177**(3): p. 637-45.
175. DeCoursey, T.E., et al., *Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?* Nature, 1984. **307**(5950): p. 465-8.
176. Pardo, L.A., et al., *Oncogenic potential of EAG K(+) channels*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5540-7.
177. Pillozzi, S., et al., *HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1791-8.
178. Millership, J.E., et al., *Calcium-activated K⁺ channels increase cell proliferation independent of K⁺ conductance*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(4): p. C792-802.
179. Hegle, A.P., D.D. Marble, and G.F. Wilson, *A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-a-go-go K⁺ channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2886-91.
180. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 11-8.



Nyilvántartási szám: DEENK/446/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fehér Ádám

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fehér, Á.**, Pócsi, M., Papp, F., Szántó, G. T., Csóti, Á., Fejes, Z., Nagy, B. J., Nemes, B. Á., Varga, Z.: Functional Voltage-Gated Sodium Channels Are Present in the Human B Cell Membrane.
Cells. 11 (7), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11071225>
IF: 6
2. **Fehér, Á.**, Pethő, Z., Szántó, G. T., Klekner, Á., Tajti, G., Batta, G., Hortobágyi, T., Varga, Z., Schwab, A., Panyi, G.: Mapping the functional expression of auxiliary subunits of KCa1.1 in glioblastoma.
Sci. Rep. 12 (1), 1-14, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26196-w>
IF: 4.6

További közlemények

3. Piga, M., Varga, Z., **Fehér, Á.**, Papp, F., Korpos, É., Banger, K. C., Frlan, R., Ilas, J., Dernovsek, J., Tomasic, T., Zidar, N.: Identification of a Novel Structural Class of H1 Inhibitors by Structure-Based Virtual Screening.
J. Chem Inf. Model. 64 (12), 4850-4862, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00240>
IF: 5.6 (2023)
4. Szántó, G. T., **Fehér, Á.**, Korpos, É., Gyöngyösi, A., Kállai, J., Mészáros, B., Óvári, K., Lányi, Á., Panyi, G., Varga, Z.: 5-Chloro-2-Guanidinobenzimidazole (CIGBI) Is a Non-Selective Inhibitor of the Human HV1 Channel.
Pharmaceuticals (Basel). 16 (5), 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16050656>
IF: 4.3





5. Kovács, Z. M., Óvári, J., Dienes, C., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., **Fehér, Á.**, Varga, Z., Szentandrassy, N.: ABT-333 (Dasabuvir) Increases Action Potential Duration and Provokes Early Afterdepolarizations in Canine Left Ventricular Cells via Inhibition of IKr. *Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (4), 488, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040488>
IF: 4.3
6. Nemes, B. Á., László, S., Zsidó, Z. B., Hetényi, C., **Fehér, Á.**, Papp, F., Varga, Z., Szőke, É., Sándor, Z., Pintér, E.: Elucidation of the binding mode of organic polysulfides on the human TRPA1 receptor. *Front. Physiol.* 14, 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2023.1180896>
IF: 3.2
7. Báta, I. Z., Dombi, Á., Borbély, É., **Fehér, Á.**, Papp, F., Varga, Z., Mócsai, A., Helyes, Z., Pintér, E., Pozsgai, G.: Investigation of the Role of the TRPA1 Ion Channel in Conveying the Effect of Dimethyl Trisulfide on Vascular and Histological Changes in Serum-Transfer Arthritis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 15 (6), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15060671>
IF: 4.6
8. Papp, F., Toombes, G. E. S., Pethő, Z., Bagosi, A., **Fehér, Á.**, Almássy, J., Borrego, J., Kuki, Á., Kéki, S., Panyi, G., Varga, Z.: Multiple mechanisms contribute to fluorometry signals from the voltage-gated proton channel. *Commun Biol.* 5 (1), 1131, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-022-04065-6>
IF: 5.9
9. Borrego, J., **Fehér, Á.**, Jost, N., Panyi, G., Varga, Z., Papp, F.: Peptide Inhibitors of Kv1.5: an Option for the Treatment of Atrial Fibrillation. *Pharmaceuticals (Basel)*. 14 (12), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14121303>
IF: 5.215





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

10. **Fehér, Á.**: A sejtciklus hatása a BK csatorna fenotípusára glioblasztóma sejteken.

Ox/PO. 1, 9-22, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.35405/OXIPO.2020.1.9>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,715

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,6**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.08.27.

