

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

---

**A Kv1.3 K<sup>+</sup> csatornák kapuzásának és expressziójának  
jellemzése T sejtekben**

Tóth Ágnes



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**A Kv1.3 K<sup>+</sup> csatornák kapuzásának és expressziójának  
jellemzése T sejtekben**

**Tóth Ágnes**

**Témavezetők: Prof. Dr. Panyi György és Dr. Krasznai Zoltán**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

## Rövidítések jegyzéke

Antigen Presenting Cell:	APC
4-aminopiridin:	4-AP
B Cell Receptor:	BCR
Calcium Release Activated Calcium channel:	CRAC
Calmodulin:	CaM
Charybdotoxin:	ChTX
Chemokine (C-C motif) receptor	CCR
Chemokine (C-X-C motif) receptor	CXCR
Citotoxikus T sejt	CTL
Clinically Isolated Syndrome:	CIS
Cluster of Differentiation:	CD
Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4	CTLA-4
1,2-diacilglicerin:	DAG
Dendritic Cell:	DC
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM
Endoplazmatikus Retikulum:	ER
Fluorescence Recovery After Photobleaching	FRAP
Foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát:	PIP <sub>2</sub>
Foszfolipáz C-gamma:	PLC- $\gamma$
Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor	GITR
Green Fluorescent Protein:	GFP
Growth factor receptor-bound protein 2 human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein	Grb2 hDlg
Intermediate-conductance Ca <sup>2+</sup> -activated K <sup>+</sup> channel	IKCa1
Immunological synapse:	IS
Intercellular Adhesion Molecule:	ICAM
Interferon-gamma:	IFN- $\gamma$
Interleukin:	IL
Inozitol 1,4,5-triszfoszfát:	IP <sub>3</sub>

Kurtzke's expanded Disability Status Scale:	EDSS
Linker for Activation of T cells	LAT
Leukocyte Functional Antigen:	LFA
Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	Lck
Lysobisphosphatidic acid:	LBPA
Major Histocompatibility Complex:	MHC
Margatoxin:	MgTX
Mitogen Activated Protein:	MAP
Nuclear Factor of Activated T-cells	NF-AT
Phosphate Buffered Saline	PBS
Platelet-Activating Factor	PAF
Primary Progressive Multiple Sclerosis:	PPMS
Protein kináz A/C:	PKA/C
Relapsing Remitting Multiple Sclerosis:	RRMS
Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 1	TRPV1
Sclerosis Multiplex:	SM
Serum Amyloid Protein:	SAP
Stromal interaction molecule 1	STIM1
SupraMolecular Activation Cluster:	SMAC
Tandem of Pore Domains in a Weak Inward Rectifying K <sup>+</sup> Channel:	TWIK
Tandem Pore Domain Halothane-Inhibited K <sup>+</sup> Channel:	THIK
TWIK-Related Acid-Sensitive K <sup>+</sup> Channel:	TASK
TWIK-Related Alkaline pH-Activated K <sup>+</sup> Channel:	TALK
TWIK-Related K <sup>+</sup> Channel:	TREK
TWIK-Related Spinal Cord K <sup>+</sup> Channel:	TRESK
T Cell Receptor:	TCR
Centrális memória T sejt	T <sub>CM</sub>
Effektor memória T sejt	T <sub>EM</sub>
Regulátor T sejt	T <sub>reg</sub>
Tetraetilammónium:	TEA
Tetrodotoxin:	TTX

Tumor Necrosos Factor:

TNF $\alpha$

Zeta-chain-Associated Protein kinase 70

ZAP-70

## Tartalomjegyzék

1	ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS .....	6
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	7
2.1	A celluláris immunválasz .....	7
2.1.1	Limfocita alpopulációk .....	7
2.1.2	T sejt alpopulációk .....	8
2.1.3	A T sejt aktivációs mechanizmusa .....	10
2.1.4	Az immunológiai szinapszis.....	11
2.1.5	Ionszatórnák és az immunológiai szinapszis.....	14
2.1.6	Az ionszatórnák szerepe a limfocita aktivációban .....	16
2.2	A Kv1.3 szatórna jellemzői .....	17
2.2.1	A Kv1.3 szatórnák biofizikai jellemzői.....	17
2.2.2	A Kv1.3 farmakológiai jellemzése.....	21
2.2.3	A Kv1.3 szatórnák szervezetszintű eloszlása.....	22
2.2.4	A Kv1.3 posztszintetikus módosítása.....	23
2.3	A kétpórusú K <sup>+</sup> -szatórnák.....	25
2.3.1	A kétpórusú K <sup>+</sup> szatórnák biofizikai jellemzői .....	25
2.3.2	A kétpórusú K <sup>+</sup> -szatórnák farmakológiája .....	27
2.3.3	A kétpórusú K <sup>+</sup> -szatórnák előfordulása és fiziológiai funkciói .....	28
2.4	A regulátor T sejtek és az autoimmunitás .....	30
2.5	Az ionszatórnák szerepe autoimmun betegségekben .....	31
2.6	A Sclerosis multiplex és az autoimmunitás .....	32
2.7	A Kv1.3 szatórna az immunológiai szinapszisban és autoimmun betegségekben ....	33
2.8	A Kv1.3 szatórnák gátlószerei specifikus immunszuppressziót okozhatnak .....	33
3	CÉLKITŰZÉSEK .....	36
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	37
4.1	Sejtek .....	37
4.2	Betegek .....	37
4.3	Áramlási citometria .....	38
4.3.1	CD4 <sup>+</sup> regulátor és naiv T sejtek szeparálása .....	38
4.4	Az immunológiai szinapszis létrehozása .....	40
4.5	Immunhisztokémia és konfokális lézer pásztázó mikroszkópia.....	40
4.6	Anyagok.....	41
4.7	Sejtek kezelése protein kináz gátlószerekkel.....	41
4.8	Elektrofiziológia .....	42
4.9	Az adatok kiértékelése.....	43
5	EREDMÉNYEK .....	45
5.1	A Kv1.3 szatórna az immunológiai szinapszisban.....	45
5.1.1	A D10 sejt vonal teljes sejt áramának biofizikai és farmakológiai jellemzése ...	45
5.1.2	A TASK szatórnák feltételes jelenlétének vizsgálata a D10 sejt vonalon .....	49
5.1.3	A kétpórusú K <sup>+</sup> szatórnák nem érzékenyek Margatoxinra.....	50
5.1.4	TASK gátlószerek hatása a Kv1.3 szatórnára .....	50
5.1.5	A Kv1.3 szatórnák kapuzása megváltozik az immunológiai szinapszisban .....	52
5.1.6	PK antagonisták gyorsítják a Kv1.3 inaktivációját .....	54
5.2	K <sup>+</sup> szatórnamintázat vizsgálata egészséges és sclerosis multiplex donoroktól izolált CD4 <sup>+</sup> regulátor és naiv T sejteken.....	58
5.2.1	Perifériás limfociták karakterizálása .....	58

	5.2.2	Az egészséges donoroktól és sclerosis mutiplexes betegektől származó naiv és regulátor T sejtjeinek ioncsatorna expressziós vizsgálata.....	62
6		MEGBESZÉLÉS.....	64
7		ÖSSZEFOGLALÁS.....	69
8		SUMMARY.....	70
9		IRODALOMJEGYZÉK.....	71
10		AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	83
11		TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK.....	84
12		ELŐADÁS ÉS POSZTER PREZENTÁCIÓK.....	85
13		TÁRGYSZAVAK.....	87
14		KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	88
15		FÜGGELÉK.....	89

## 1 ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az ioncsatornák a sejtmembránt teljes egészében átérő, több fehérje alegységből felépülő szupramolekuláris struktúrák, amelyek hidrofíl pórusokat hoznak létre a membránon keresztül. A csatornára jellemző kationok vagy éppen anionok a pórusokon keresztül képesek áramlani az elektrokémiai gradiens által meghatározott irányban a csatorna nyitott állapotában. Általánosan elmondható, hogy a csatornák egyetlen kinyílása alatt nagyszámú ion transzportálódik a membrán egyik oldaláról a másikra, ezáltal az ioncsatornák hatékonyan képesek szabályozni a sejt membránpotenciálját és az intracelluláris ionmiliót.

Hagyományosan az ioncsatornák szerepe az ingerelhető sejtekhez köthető: az akciós potenciál létrehozása, valamint annak fenntartása, s ezáltal számos élettani funkció, mint pl. szívműködés, mozgás, érzékelés, izomkontrakció, neurotranszmitter szekréció stb. folyamatokban vesznek részt. Az 1980-as évek közepétől kezdve azonban egyre több tanulmány is beszámolt arról, hogy a klasszikus értelemben nem-ingerelhető sejtek, köztük különféle immunsejtek, mint pl. a T limfociták plazmamembránjában is sokféle ioncsatorna található, melyeknek szerepe van a megfelelő immunválasz kialakításában.

A limfocitamembrán domináns feszültségkapuzott  $K^+$  csatornája a Kv1.3 központi szerepet játszik a T sejtek antigénekkal és mitogénekkal kiváltott aktivációjának és proliferációjának szabályzásában azáltal, hogy a  $Ca^{2+}$ -aktivált IKCa1 csatornákkal együtt döntően meghatározzák a T sejtek membránpotenciálját, s ezen keresztül a sejtek aktivációjában kulcsszerepet játszó  $Ca^{2+}$ -jelátvitelt. Ezen felül kimutatták, hogy a csatorna szerepet játszik az immunológiai szinapszisban, feldúsulva az antigén prezentáló sejt és a T sejt közötti kontaktrégióban.

A Kv1.3 csatornák szerkezetének és funkciójának megismerésében nagy szerepe volt a Kv1.3 csatornákat gátló peptid toxinoknak és az igen szerteágazó kémiai szerkezetű ún. kis-molekula Kv1.3 inhibitoroknak. A Kv1.3 csatornák specifikus, nagy affinitású gátlószereinek felfedezését célzó vizsgálatok fontosságára mutat az is, hogy előtérbe került az ilyen molekulák terápiás célú felhasználása egyes autoimmun betegségek kezelésére szelektív immunszuppresszió megvalósításán keresztül. A Kv1.3 csatornák farmakológiai és biofizikai vizsgálata nagy jelentőségű lehet a T sejtek működésének és a csatornafehérje immunválaszban betöltött szerepének feltárásában.

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A celluláris immunválasz

Az immunrendszer sejtjei nem tömörülnek egyetlen szervbe, hanem elszórtan, elsősorban a vérben és a nyirokrendszerben található meg nagy számban. A nyirokszerveket funkciójuk alapján elsődleges (központi) vagy másodlagos (perifériás) nyirokszerveknek nevezzük. Míg az előbbiek a limfociták immunkompetens sejté érésehez biztosítanak megfelelő mikrokörnyezetet azáltal, hogy az antigénkötő receptorokat kódoló génjeik átrendeződnek, és a gének fehérjetermékei megjelennek a sejtek membránján, addig az utóbbiak biztosítják a helyszínt a patogének ill. antigének idegen struktúráinak specifikus receptorokkal való felismeréséhez, a fajlagos immunválasz kialakulásához. Mindehhez az immunsejtek – elsősorban a limfociták, dendritikus sejtek és makrofágok – folyamatos migrációja szükséges, mivel a kórokozók számos ponton juthatnak be a szervezetbe.

A szervezetbe kerülő antigének a behatolás helyéhez legközelebb eső nyirokcsomóban, a véráramba jutó idegen anyagok a lépben halmozódnak fel. Ha a nyugvó  $G_0$ -fázisban lévő limfociták nem találkoznak antigénnel, akkor 1-2 napon belül elpusztulnak, és helyettük újak termelődnek a csontvelői előalakokból. Aktiváció esetén az idegen struktúrára specifikus sejtek a kölcsönhatás eredményeként  $G_1$ -fázisba jutnak, majd limfoblasztokká alakulnak: a sejtek megnőnek, megnő a citoplazma RNS-tartalma is. A blasztos transzformáció folyamata az S-fázisban a DNS-szintézis fokozódásához, majd az M-fázisban osztódáshoz vezet; ez antigéninger esetén a kiválasztott sejtek klonális osztódását jelenti, azonos antigénkötő receptormolekulákat hordozó limfociták klónjai alakulnak ki. Ez tulajdonképpen a klónszelekció folyamata, amely a specifikus immunválasz alapját képezi. A proliferálódó sejtek egy része effektor ( $T_{EM}$ ), más részük centrális memóriasejtté ( $T_{CM}$ ) differenciálódik, amelyek közvetve vagy közvetlenül képessé válnak az antigén eliminálására [1].

#### 2.1.1 Limfocita alpopulációk

Az immunválasz során betöltött szerepüket és sejtfelszíni struktúráikat tekintve a limfociták három fő csoportba sorolhatók: B-sejtek, T sejtek és természetes ölősejtek (Natural Killer – NK-sejtek). A B és T sejtek fénymikroszkóppal nem elkülöníthető kis limfociták,

nagy maggal, és keskeny citoplazmával rendelkeznek. A természetes ölösejtek pedig nagyobb méretű limfociták, és citoplazmájuk számos granulomot tartalmaz.

A T sejtek előalakjai a csontvelőben képződnek, és onnan vándorolnak a csecsemőmirigybe, a tímuszba. Ezek a sejtek a timociták, amelyek megfelelő környezeti tényezők hatására érnek immunkompetens T sejtekké. A perifériás nyirokszervekbe már az antigéneket fajlagosan felismerni képes receptorstruktúrákkal rendelkező T-limfocitákként jutnak el. A T sejtek nem termelnek ellenanyagot. A membránjukon megjelenő antigénkötő struktúra, a TCR (T-cell Receptor), szerkezetileg hasonló a BCR-hez (B-cell Receptor) – mindkettőt az Ig-szupercsaládba tartozó gének kódolják – de antigénfelismerő funkciójuk eltérő. Lényeges különbség a T- és B-sejtek antigénfelismerő képessége között az, hogy a T-limfociták nagy többsége a fehérjetermészetű antigénekből származó peptidok lineáris szekvenciáit csak az ún. antigénprezentáló sejtek (APC-k) membránján megjelenő fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex - MHC) molekulákhoz kötött formában ismerik fel, ellentétben a B-sejtekkel, amelyek az intakt antigének konformációs determinánsaival képesek kölcsönhatni, és az antigénnel specifikusan reagáló ellenanyag-molekulákat termelnek.

Az immunválasz nagyfokú fajlagosságát és az immunológiai memóriát csak a limfociták képesek biztosítani, mivel kizárólag ezek a sejtek rendelkeznek olyan sejtmembránstruktúrákkal, amelyek az antigéneket specifikusan ismerik fel [1].

### **2.1.2 T sejt alpopulációk**

A T-limfocitáknak a T sejt receptor szerkezete alapján két csoportja különböztethető meg: az  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncból álló TCR az emberi vér T sejtjeinek 90-95%-án, míg a  $\gamma$ - és  $\delta$ -láncból álló heterodimer azok 5-10%-án van jelen. Egy adott T sejten csak  $\alpha\beta$ - vagy  $\gamma\delta$ -receptor van jelen. Az  $\alpha\beta$  TCR-t hordozó sejtek sejtfelszíni markereik és különböző effektor funkciójuk alapján további alcsoportokra oszthatók. A két legjobban ismert és jellemzett alcsoport a  $CD4^+$  segítő (helper –  $T_H$ ) és a  $CD8^+$  ölő (citotoxikus –  $T_C$ ) sejtek alpopulációja. A  $CD4^+$  segítő T sejtek az MHCII, míg a  $CD8^+$  citotoxikus T-limfociták az MHCI molekulával asszociált peptidet ismerik fel, s a célsejt pusztulását okozó anyagokat termelnek. Az antigén hatására történő aktiváció, valamint az antigént bemutató sejttel való kölcsönhatás eredményeként a  $T_H$ -sejtek limfokinek széles skáláját termelik. Ezek a kisméretű molekulák elengedhetetlenül szükségesek a specifikus immunfolyamatok kialakulásához, mivel előidézik

a T- és B-sejtek, a makrofágok, továbbá számos más sejtféleség proliferációját és differenciálódását, ill. befolyásolják e sejtek különböző funkcióit. Ugyanakkor ezek az anyagok fontos kapcsot jelentenek a természetes és az adaptív immunrendszer működése között is azáltal, hogy a gyulladásos folyamatokban döntő szerepet játszó makrofágokat és granulocitákat a reakció helyszínére vonzzák, és ott aktiválják. Attól függően, hogy milyen citokineket termelnek, a  $T_H$  sejtek három további alpopulációba sorolhatók: A  $T_{H1}$ -sejtek elsősorban a makrofágokat aktiváló, a gyulladásos és a citotoxikus folyamatokban szerepet játszó limfokineket (IL-2,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ) termelik, és így főleg az intracelluláris kórokozók elleni védelem során elengedhetetlenek. A  $T_{H2}$ -sejtek által termelt limfokinek (IL-4, IL-5, IL-6 és IL-10) elsősorban a B-limfociták aktiválásában és ellenanyag-termelő sejté érésében játszanak döntő szerepet, és így főként az extracelluláris kórokozók elleni hatékony humorális immunválasz közvetítői [1]. A  $T_{H17}$  sejtek az IL-17, egy gyulladást elősegítő (proimmflamatorikus) citokin valamint IL-22, IL-26,  $IFN\gamma$  és CCL20 termelésére képesnek, felszínükön IL-23 és CD45RO receptorokat fejeznek ki. Fontos szerepet játszanak az autoimmun betegségek patogenezisében és a gyulladásos reakciókban. Az eddigi adatok szerint a  $T_{reg}$  és  $T_{H17}$  sejtek kialakulása között fordított arány figyelhető meg. Egerekben mindkét alcsoport kialakulásához TGF- $\beta$  szükséges, ugyanakkor IL-6 hatására naiv T sejtek a  $T_{reg}$  irányból a  $T_{H17}$  sejt differenciálódás felé tolódnak. A természetesen előforduló  $T_{reg}$  sejtek heterogén sejtpopulációt képeznek, amelynek tagjai Foxp3-at, valamint nagy mennyiségű CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4) és GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor) fehérjéket expresszálnak. A  $T_{reg}$  sejtek gátló működésének pontos mechanizmusa vitatott, és nem teljesen tisztázott terület. Feltételezések szerint ezek a sejtek részben közvetlen sejt-sejt kontaktus, továbbá IL-10 és TGF- $\beta$  termelés útján fejtik ki hatásukat [2].

A CD45 egy protein kináz foszfatáz, amely az Lck tirozin kináz defoszforilációján keresztül kritikus szerepet játszik a T sejtek aktivációjában. Különböző CD45 izoformák fejeződnek ki a T sejt differenciálódásának szakaszaiban, amelyek ezáltal hasznos markerek a T sejtek csoportosításában. A naiv T sejtek a CD45 receptor CD45RA izoformáját fejezik ki sejt felszínükön. A CD45RO izoformára nézve negatívak, amely az aktivációt követően jelenik meg a CD27 és CD62L receptorok mellett a memória T sejtek felszínén. A naiv, aktivált és memória T sejtek aránya klinikai jelentőséggel bír, mert ez alapján lehet diagnosztizálni számos autoimmun, gyulladásos megbetegedést vagy immundeficienciát. Az egyszeri antigén stimulus hatására centrális memória T sejtek alakulnak ki, amelyek a

másodlagos nyirokszervekbe migrálnak. A  $T_{CM}$  sejtek főleg interleukin-2-t (IL-2) termelnek majd ismételt antigén stimulus hatására proliferálódnak, effektor sejtekké differenciálódnak, és nagy mennyiségű IFN- $\gamma$  vagy IL-4 molekulákat termelnek. A humán  $T_{EM}$  sejtek CCR7 receptorokkal nem rendelkeznek a naiv sejtekkel ellentétben, és heterogének a CD62L expresszióra nézve - ezt a naiv sejtek szintén kifejezik. A  $T_{EM}$  sejtek olyan karakterisztikus kemokin receptorokat és adhéziós molekulákat fejeznek ki, amelyek elengedhetetlenek a gyulladásos szövetekhez való vándorláshoz. A szerzett immunitás reaktív memóriájáért tehát a  $T_{CM}$  sejtek, protektív memóriájáért a  $T_{EM}$  sejtek, felelősek [3].

A  $CD8^+$   $T_{EM}$  sejtek nagy mennyiségű perforint szállítanak, és az antigén stimulust követően a  $CD4^+$  sejtekhez hasonlóan IFN- $\gamma$ , IL-4 és IL-5 molekulákat termelnek. A  $CD8$  sejtek egy része CD45RA receptorokat is expresszál, ezek a  $T_{EMRA}$  sejtek, amelyek a legnagyobb mennyiségű perforint szállítják.

*In vitro* stimulus hatására a T sejtek alacsony aktivációs küszöböt, és élénk proliferációt mutatnak, bár ez a hajlam a  $T_{CM}$  sejtektől a  $T_{EM}$  sejteken át a  $CD8 T_{EMRA}$  sejtek irányába csökken, ami jól korrelál a telomer hosszúsággal és a megnövekedett apoptotikus hajlammal [4, 5]. *In vitro* stimulus hatására a  $T_{CM}$  sejtek heterogén módon differenciálódnak. Antigén stimulus hatására a  $CCR7^+$  fenotípus eltűnik a  $T_{CM}$  sejtek effektor sejtekké való differenciálódása közben. A  $T_{EM}$  sejtek CCR7 negatívak, és fenntartják a citokin génexpressziót. *In vivo* esetben a  $T_{CM}$  sejtek, amelyek a másodlagos nyirokszervekkel kapcsolatban vannak, érett dendritikus sejtek által bemutatott antigénekkal stimulálhatók, míg a  $T_{EM}$  sejtek, melyek ezeket a régiókat nem érik el, és a környezet nem kedvez a sejt-sejt stabil kölcsönhatásoknak, nem hivatásos APC-k által bemutatott antigénekkal stimulálhatók [6, 7].

Mindehhez hozzátartozik azonban, hogy ezeknek a markereknek egy része T sejt aktiváció során módosulhat, pl. antigénstimulus hatására a  $T_{EM}$  sejtek átmenetileg a CCR7 és CXCR5 molekulákat pozitív, míg a CCR5 molekulát negatív irányban szabályozzák [8]. A TCR triggert, vagy a nyirokcsomóba vándorlást követően a sejtek a CD62L-t átmenetileg elvesztik [9, 10]. Ezért a  $T_{CM}$  és  $T_{EM}$  sejtek fenotípusos karakterizálása csak nyugvó sejtekre érvényes, amelyek az antigén által vezérelt válaszfolyamatban nem vesznek részt.

### **2.1.3 A T sejt aktivációs mechanizmusa**

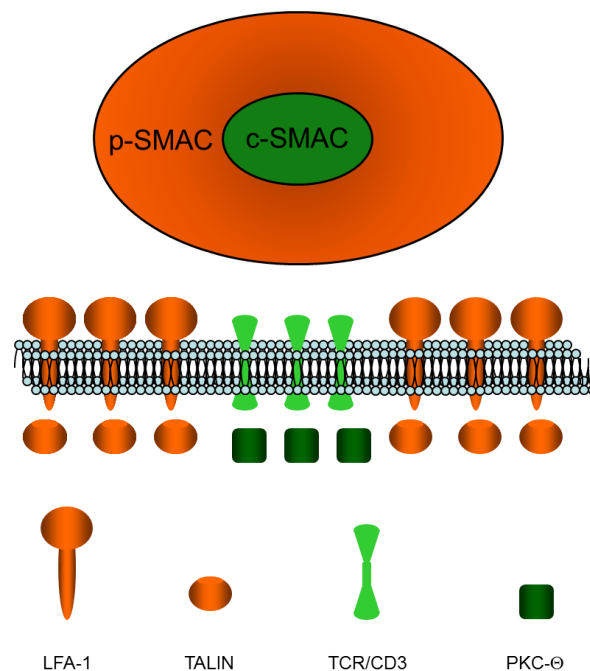
A limfociták specifikus antigén hatására bekövetkező klonális proliferációja az immunrendszer működésének egyik meghatározó eseménye. A limfocita proliferáció a T sejt

receptor/CD3 komplex (TCR/CD3) aktiválását követően indul be, amikor az antigénprezentáló sejt fő hisztokompatibilitási komplex molekuláján keresztül az antigén egy adott peptidrészletét bemutatja a specifikus T limfocita számára, ezáltal egy MHC-peptidfragmentum-TCR/CD3 komplex jön létre. Ez az első szignalizációs lépés számos kináz és a foszfolipáz C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) aktivációját vonja maga után. A PLC $\gamma$  aktivációját követően a szignalizációs útvonal két részre ágazik: a PLC $\gamma$  foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) 1,2-diacilglicerinné (DAG) és inozitol 1,4,5-triszfoszfáttá (IP<sub>3</sub>) hasítja. A DAG molekula a protein kináz C enzimet (PKC) aktiválja, amely számos intracelluláris szubsztrátot foszforilál, és egy transzkripciós faktor, az AP-1 sejtmagban való felhalmozódását segíti elő. A jelátvitelben a protein kinázok mellett a T limfocita aktiváció fontos lépése a citoszolikus Ca<sup>2+</sup>-koncentráció kétfázisú megemelkedése. Ezt a folyamatot egyrészt a citoszolban szabadon diffundáló IP<sub>3</sub> molekula az endoplazmatikus retikulum (ER) membránján kifejeződő receptorokhoz való kötődése aktiválja, amely során az aktivált limfocitában a szabad Ca<sup>2+</sup>-koncentráció megnövekszik a nyugvó állapothoz képest. Az IP<sub>3</sub>-receptor itt tehát egy intracelluláris ligandkapuzott ioncsatornaként működik, és az endoplazmatikus retikulumból Ca<sup>2+</sup> szabadul fel. Ez a citoszolikus Ca<sup>2+</sup> komponens azonban nem elegendő a gén expresszió vezérléséhez. A magas intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció elérésének és fenntartásának forrása az extracelluláris tér. Az endoplazmatikus retikulum kiürülésével aktiválódnak a STIM1 molekulák (Stromal interaction molecule 1), amelyek az ER membránjának azon részére migrálnak, ahol aktiválni tudják a plazmamembránban található Orai1 molekulákat, amelyek a kalcium felszabadulás aktivált Ca<sup>2+</sup> (CRAC) csatorna pórusát alkotják. A CRAC-on keresztüli Ca<sup>2+</sup>-beáramlás a Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt a nyugvó 50-100 nM-os tartományból az alsó mikromoláris tartományba emeli. [11, 12]. A tartós, legtöbb esetben oszcilláló intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációemelkedés a kalmodulinon (CaM) keresztül aktiválja a kalcineurint. Ez elősegíti az NF-AT transzkripciós faktor magba történő transzlokációját, aminek következtében az IL-2 gén aktiválódik, és a többi jelátviteli mechanizmussal (MAP kináz, Ras, Fos) szorosan együttműködve beindítja a sejtek proliferációját. Az IL-2 expresszió szükséges a további, immár antigénfüggetlen T sejt aktivációhoz.

#### **2.1.4 Az immunológiai szinapszis**

In vivo körülmények között a T limfocita-aktiváció első lépése, hogy az antigénprezentáló sejt MHC fehérjéihez kötődő antigén és a TCR/CD3 kölcsönhatása során kialakul az immunológiai szinapszis (IS), azaz megtörténik az antigén bemutatása. Az IS az

antigént prezentáló és az azt felismerő sejt közötti interakciós felszint jelenti. Az IS kialakulása a két sejt plazmamembrán fehérjéinek átrendeződését és szubcelluláris membrándoménekbe történő szegregációját eredményezi [13, 14], ezáltal létrehozva az ún. szupramolekuláris aktivációs komplexet (SMAC). Abraham Kupfer definiálta elsőként a T és B sejt-konjugátumok közötti, központi TCR komplexet centrális szupramolekuláris aktivációs klaszterként (cSMAC) [15]. Továbbá kiderült, hogy a cSMAC két elkülönülő régióként, egy belsőbb és egy külsőbb cSMAC-ként jellemezhető. Az előbbiben nagy mennyiségű TCR, az utóbbiban a CD28 és PKC- $\theta$  membrán- és citoszolikus fehérjék dominálnak az immunológiai szinapszis T sejt felőli oldalán. Az immunológiai szinapszis kialakításában résztvevő két sejt közötti kontaktus stabilizálásában a CD3 receptor által kijelölt cSMAC régió mellett, a perifériális SMAC (pSMAC) is szerepet játszik [15] (1. ábra). A központi szupramolekuláris egységet az LFA-1 és az ICAM-1 kölcsönhatás által kialakult gyűrű, valamint a talin határolja, ez az ún. perifériális szupramolekuláris aktivációs klaszter. Az LFA-1 és az ICAM-1 molekulák kezdetben adhéziós molekulákként funkcionálnak, elősegítve a T sejt - APC illetve a TCR – MHC-peptidfragmentum kapcsolatot. Az ICAM-1-hez kötődő LFA-1 a pSMAC hálózatba integrálódik, amely folyamattal a T sejt antigén-szenzitivitását akár 100-szorosára növelheti az LFA-1 részvételét megelőző állapothoz képest [16]. Az LFA-1 mikroklaszterbe való beépülése és a pSMAC képződése nagymértékben függ a talin aktivitástól és a miozin IIA-alapú összehúzódástól.



**1. ábra.** p-SMAC és c-SMAC, az immunológiai szinapszis keresztmetszete. TCR, LFA-1, PKC- $\theta$ , talin molekulák átrendeződései [15]

Az említett régiók mindegyike molekulák ezreit tartalmazza, amelyek nem-kovalens módon kötődnek egymáshoz ebben a funkcionális hálózatban. A fehérjék térbeli orientációja biztosítja azt, hogy a TCR/CD3 komplex aktiválása hatékony legyen a protein kinázok molekuláris közelségbe kerülése eredményeként [17]. Kupfer később egy ún. disztális szupramolekuláris aktivációs klasztert (dSMAC) is definiált mint a struktúra legkülsőbb régióját, amelyben többek között a CD45 játszik szerepet. A disztális pólus komplexet Burkhardt írta le, amely olyan specifikus negatív regulátorok elkülönítése szempontjából lehet lényeges, mint pl. az SHP-1 [18]. Az 1. táblázat foglalja össze a szinapszist felépítő molekulákat a T illetve az antigénprezentáló sejt oldaláról.

SMAC	T sejt	APC
Centrális (cSMAC) <sub>a</sub>	CD3, TCR (variábilis), LBPA	MHC-peptid (variábilis)
Centrális (cSMAC) <sub>b</sub>	PKC- $\Theta$ , CD28	CD80
Perifériás (pSMAC)	LFA-1, CD2, Talin, F-aktin	ICAM-1, CD48/CD58
Disztális (dSMAC)	CD45?, CD4?, F-aktin	?
Disztális pólus komplex	CD43, SHP-1, PKC- $\gamma$	?
TCR mikroklaszterek	TCR, Lck, ZAP-70, SLP-76, LAT, Grb2	MHC-peptidek

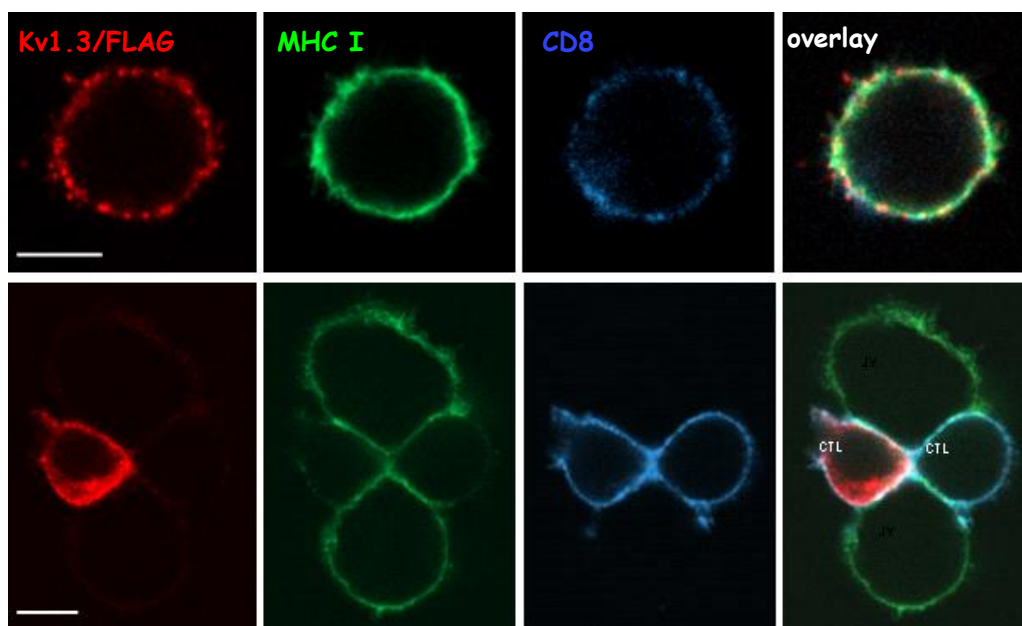
**1. táblázat.** Az immunológiai szinapszist felépítő molekulák. (cSMAC)<sub>a</sub> és <sub>b</sub>: belsőbb és külsőbb centrális régiók, LBPA: lysobisphosphatidic acid [18]

Nemcsak az adhéziónak, de a kostimulációs fehérjéknek is kritikus szerepet játszanak a TCR mikroklaszterek kialakulásában. A CD28 kostimulációs receptor a CD80-nal képez komplexet, amely cSMAC-ba vándorol. Itt a CD28 és a PKC- $\Theta$  dinamikus feldúsulást mutat a TCR-rel ellentétben, amelyet FRAP kísérletekkel igazoltak. A CD2 adhéziónak és egyben kostimulációs funkciókat is betölt: APC oldali ligandjai a CD48/CD58. A CD2 T sejt aktivációs küszöböt csökkenti [19], a Fyn kináz által PLC- $\gamma$ 1 foszforilációját indukálja [20, 21] ezzel az intracelluláris kalciumszintet potenciózza. Ugyanakkor a CD2 elősegíti a T sejt adhéziónak az APC-hez, mivel a CD58 receptorral egy TCR - peptidfragment-MHC komplexhez hasonló membránok közötti kölcsönhatást hoz létre. A kötött CD2 egy része a cSMAC komplexbe vándorol, bár mivel a pSMAC-ban jelen lévő Fyn kinázzal asszociál, a molekulák nagy része is a periférián dúsul fel. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció

emelkedésének stabilizáló hatása is van; a T sejtet immobilizálja az immunológiai szinapszis kialakulását követően.

### 2.1.5 Ioncsatornák és az immunológiai szinapszis

Laboratóriumunkban korábban elvégzett kísérletekkel elsőként igazolták, hogy a FLAG-extracelluláris epitóppal rendelkező, Jurkat sejtekben expresszált Kv1.3 csatornák és a CD3 molekulák átfedő membrán doménekben helyezkednek el, amit keresztkorrelációs számításokkal is igazoltak [22]. Továbbá, ha ugyanezen csatornakonstruktokat citotoxikus T sejtekben fejezték ki (CTL), akkor azok citotoxikus T limfociták és komplementer target sejtek között létrejött IS-ba rendeződnek át, a csatornák polarizált expressziót mutatnak [23] (2. ábra).

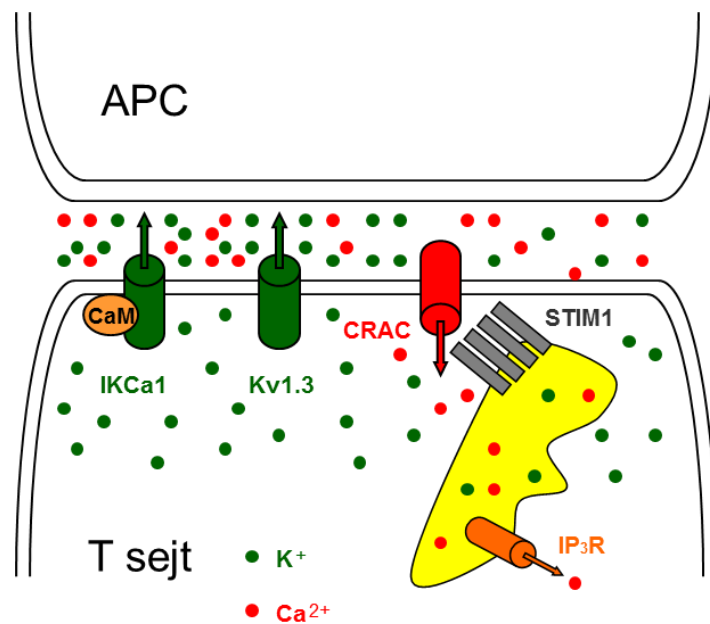


**2. ábra.** Kv1.3/FLAG átrendeződése az immunológiai szinapszisba. Nyugalomban lévő citotoxikus T sejtek (CTL) teljes membránján a Kv1.3 csatornák foltszerű elrendeződést vesznek fel (felső sor), míg target sejttel immunológiai szinapszisba kerülve a csatornák a két sejt közötti kontaktrégióban dúsulnak fel (alsó sor; lépték: 5 $\mu$ m).

Később más munkacsoportok is megerősítették ezt az eredményt, továbbá leírták, hogy a Kv1.3 csatornák mellett az IKCa1 (intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>) csatornák is feldúsulnak az APC-T sejt kontakt régióban [22-26]. Cahalan és munkatársai kimutatták, hogy a STIM1 és Orai1 fehérjék megjelennek a dendritikus sejt (DC) - T sejt

alkotta pár immunszinapszisában. [27]. A csatornafunkció és a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál nem játszik kulcsszerepet a szinapszis kialakulásának kezdeti szakaszában, a Kv1.3 vagy a CRAC csatornák gátlása nem befolyásolja a molekulák klaszterekbe rendeződését [24, 25, 27], azonban a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás gátlása növekvő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -puffereléssel kombinálva hatással van a szinapszis hosszú távú stabilitására. Így a CRAC csatorna szinapszisba történő vándorlása, ahol különböző receptorok, adhéziós és kostimulációs molekulák is akkumulálódnak, az antigénstimuláció hatására bekövetkező hosszú távú  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli szabályozásban játszhat szerepet.

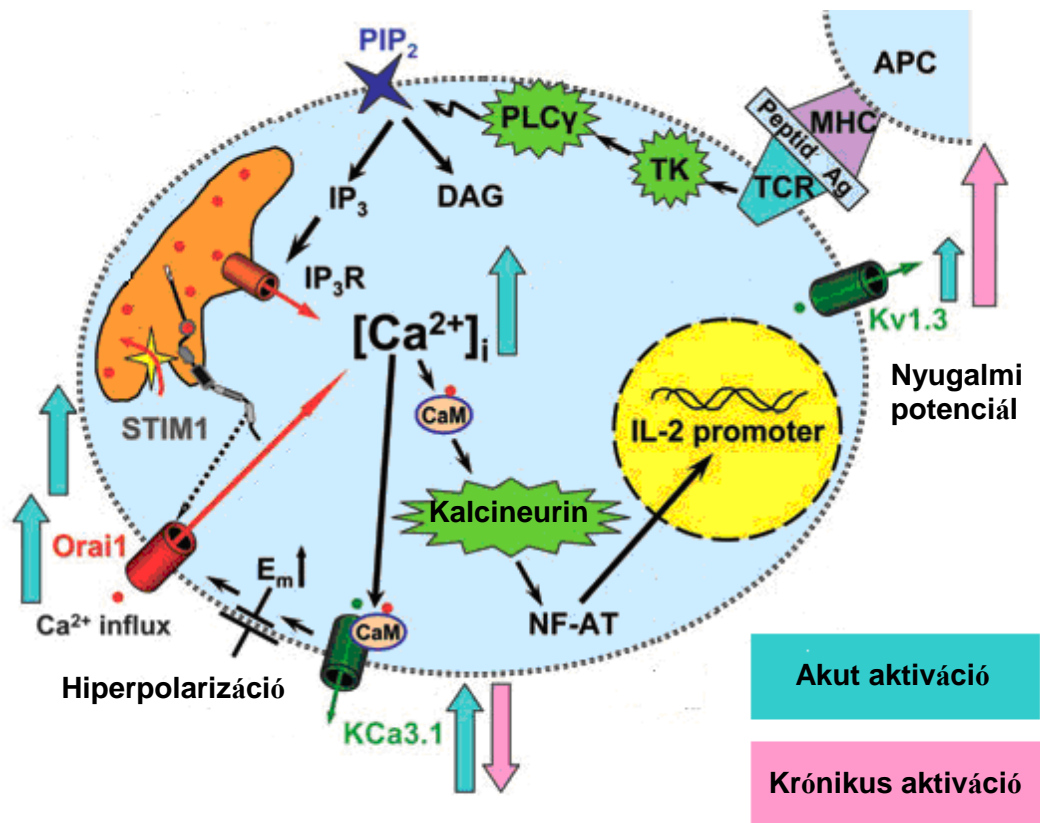
A CRAC csatornák szinapszisban történő feldúsulása a  $\text{Ca}^{2+}$  influx által lokálisan nagy intracelluláris, és kis extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szintet eredményez. A Kv1.3 és IKCa1 csatornák jelenlétének eredményeképpen  $\text{K}^+$  efflux jön létre, ami a  $\text{K}^+$ -ionok koncentrációját intracellulárisan lecsökkenti, az extracelluláris térben pedig megnöveli, azaz az APC és T sejt közötti szinaptikus résben lokális  $\text{K}^+$ -koncentráció-emelkedés jön létre, ami a T sejt membránjának depolarizációját eredményezi [28] (3. ábra).



**3. ábra.** Ioncsatornák és az általuk közvetített ionok az immunológiai szinapszisban. A  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli útvonal során a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció lokálisan csökken, míg a  $\text{K}^+$  ionok felhalmozódnak az APC és T sejt alkotta szinaptikus résben [28].

### 2.1.6 Az ioncsatornák szerepe a limfocita aktivációban

A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli útvonal meghatározóan függ a plazmamembránban elhelyezkedő  $\text{K}^+$  csatornák aktivitásától. A nyitott CRAC csatornákon keresztül folyó  $\text{Ca}^{2+}$ -áram elektrokémiai hajtóerejéhez komoly hozzájárulást ad a sejtek membránpotenciálja [29, 30]. A T sejtek membránpotenciálja  $-50 - -60$  mV között van. A beáramláshoz szükséges feltétel a negatív membránpotenciál, melynek stabilizálásában a feszültségfüggő depolarizáció-aktivált  $\text{Kv}1.3$  és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{IKCa}1$   $\text{K}^+$  ioncsatornák vesznek részt [31, 32]. E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás a sejtmembránt hiperpolarizált állapotban tartja még a depolarizáló hatást jelentő  $\text{Ca}^{2+}$ -influx mellett is, biztosítva ezzel a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő  $\text{Ca}^{2+}$ -mediált jelátvitelt. A két csatornának a folyamathoz való relatív hozzájárulása a csatornák relatív sejtfelszíni expressziójától függ, amely az akut és krónikus aktivációs állapotok közötti változásoknak megfelelően alakul. A  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációban bekövetkező oszcilláció során a CRAC és a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{K}^+$  csatornák szabályos impulzusokban nyitnak és zárnak. A CRAC csatorna a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel csúcsa előtt inaktiválódik, ugyanakkor a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  csatorna aktiválódik, elősegítve ezzel az ismételt CRAC csatornán keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -influxot [28] (4. ábra).



**4. ábra.** Ioncsatornák a T sejtek jelátviteli kaszkádjában. Az ábrán szereplő főbb ioncsatornák funkciói a következők: A Kv1.3 a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában játszik szerepet; az IKCa1 a citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  megemelkedése során hiperpolarizálja a membránt; az Orai1 alkotja a CRAC csatorna pórusformáló alegységét, amely az ER kiürülését követően a STIM1 fehérjék által aktiválódik.

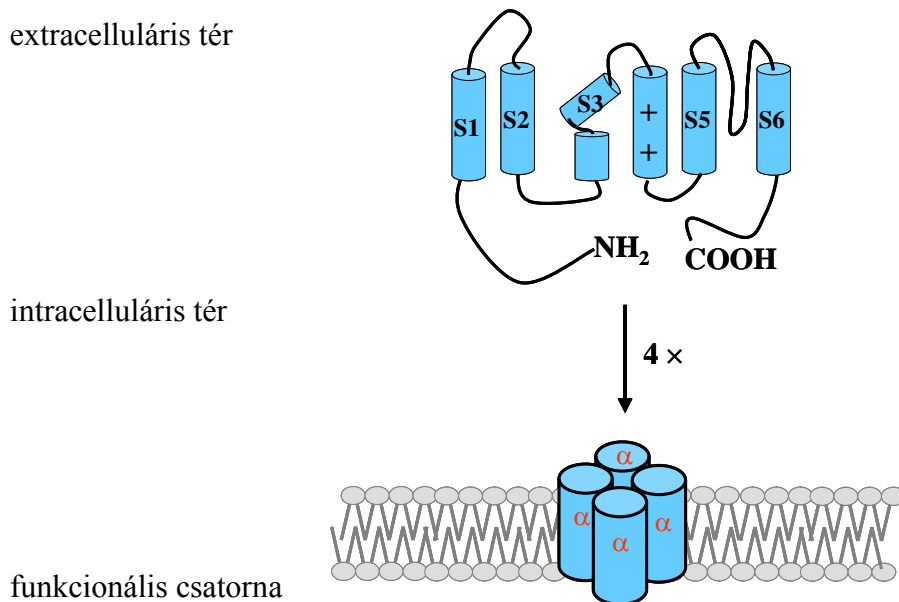
A T sejtek aktiválásának  $\text{K}^+$  csatorna-aktivitás függésére közvetlen bizonyítékot az szolgáltat, hogy pl. nagy affinitású Kv1.3- és IKCa1-gátlószerek alkalmazásával a T sejtek depolarizálhatók, ami gátolja a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulását, így a T sejtek egyes alcsoportjainak osztódása szelektíven gátolható [33-40].

## 2.2 A Kv1.3 csatorna jellemzői

### 2.2.1 A Kv1.3 csatornák biofizikai jellemzői

A limfocitamembrán domináns feszültségkapuzott  $\text{K}^+$  csatornáját, a hKCNA3 gén által kódolt Kv1.3 csatornát 1984-ben írták le [31, 41]. A Kv1.3 csatorna, mely felelős a limfociták n-típusú áramának kialakulásáért, a  $\text{K}^+$  csatornák *Shaker* családjába tartozik [42]. Roderick MacKinnon kísérleteiben kimutatta, hogy a *Shaker* csatornák négy azonos, megközelítőleg szimmetrikusan elhelyezkedő alegységből felépülő tetramer makromolekulák [43].

Mindegyik alegység kb. 500 aminosavból áll, az alegységek közötti nem-kovalens kötések tartják egyben a tetramer csatornát. Az egyes alegységek hat transzmembrán alfa-helikális szegmensből állnak, melyeket extra- és intracelluláris hurkok kapcsolnak össze. Ezen szegmenseknek és hurkoknak jól meghatározott szerepük van a csatorna működésében. A szegmensek közül az első négy felelős a csatorna nyitásáért – különösen a negyedik az itt található pozitív töltésű aminosavak miatt kitüntetett szerepet játszik az aktiváció során –, míg az ötödik és hatodik szegmens közötti extracelluláris hurok alakítja ki a csatorna pórusát (5. ábra). Ebben a szakaszban található az a négy aminosavból álló szekvencia (GYGD), amely felelős a  $K^+$  szelektivitásért [44, 45], továbbá a csatorna pórusát eltömítő gátlószerek is e régió aminosav oldalláncaival lépnek kölcsönhatásba [46-49]. A pórus és a szelektivitási filter szerkezetére ezen adatok alapján levont következtetéseket MacKinnon és munkatársai röntgen-kristallográfiás kísérletei igazolták.



**5. ábra.** A Kv1.3 csatorna szerkezete: négy azonos, megközelítőleg szimmetrikusan elhelyezkedő alegységből ( $\alpha$ ) felépülő tetramer makromolekula. Az egyes alegységek hat transzmembrán alfa-helikális szegmensből állnak ( $S_1 - S_6$ ), melyeket extra- és intracelluláris hurkok kapcsolnak össze.

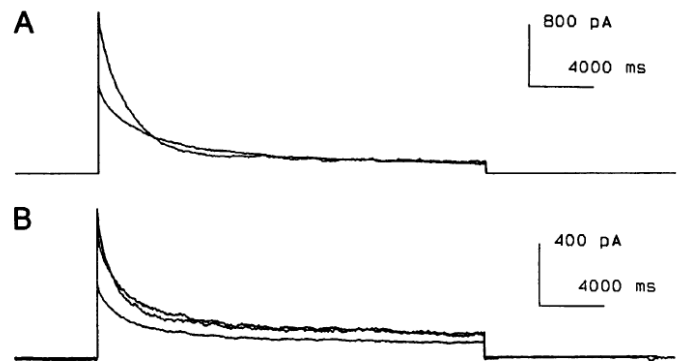
A *Shaker* csatornákhöz hasonlóan a Kv1.3 csatornák is a membrán depolarizációjára nyílnak ki, mely a négy alegység kooperatív mechanizmusa révén jön létre [50]. A membránpotenciál változásait a csatorna feszültség-szenzora érzékeli, melyet a többszörösen pozitív töltésű S4 hélixek és a nettó negatív töltést hordozó S3 hélixek közösen alkotják. A feszültség-szenzor membránpotenciál-függő elmozdulása az aktivációs kapu kinyílását

eredményezi [51-54]. A Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbfeszültsége  $-50$  mV körül van, ami megegyezik a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljával. Az aktivációs küszöb felett a membrán további depolarizációjával a nyitási valószínűség meredeken emelkedik [55]. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése a szigmoid futású Boltzmann-függvénnyel jellemezhető,  $+20 - +30$  mV körül éri el a telítési értéket, ekkor a csatornák nyitási valószínűsége 1. A Kv1.3 csatornák egyensúlyi inaktivációja nem teljes a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljánál [56]. Az egyensúlyi aktiváció és az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése egy olyan membránpotenciál-ablakot határoz meg, amelyen belül a Kv1.3 csatornák aktívak. Ez az ablak a limfociták nyugalmi membránpotenciál-értékének megfelelő feszültségeknél van, így a Kv1.3 csatornákon keresztüli  $K^+$ -fluxus hozzájárulhat a diffúziós membránpotenciál kialakításához [56, 57].

A gyors aktivációt követően, depolarizált membrán mellett a *Shaker*  $K^+$  csatornák inaktívált állapotba kerülnek, amely egy stabil, nem-vezető állapot, és szintén konformáció-változás eredménye. Kétféle, az ún. N- és C-típusú mechanizmus révén valósulhat meg. Az N-típusú, gyors inaktiváció néhány ms alatt jön létre, és az ún. „labda-és-lánc” („ball-and-chain”) modell jellemzi, amelyben a fehérje intracelluláris N-terminális oldalán egy több pozitív töltést tartalmazó peptid szakasz („labda”) blokkolóként viselkedik úgy, hogy a csatorna citoplazma felőli oldalán bekötődik, ezáltal elzárja a pórust. Azonban számos *Shaker*  $K^+$  csatornában, köztük a Kv1.3-ban is hiányzik ez az inaktivációs egység, így inaktivációjukért az ún. lassú, C-típusú mechanizmus a felelős, amely néhány 100 ms, vagy akár több s alatt következik be.

A C-típusú inaktiváció valószínűleg a szelektivitási filter és a csatorna extracelluláris bejárata környékén összetett mechanizmussal lejátszódó konformáció-változás eredménye. Az N- és C-típusú inaktiváció sztöchiometriájukban is különbözik; míg az N-típusú inaktiváció során az inaktivációs domének egymástól függetlenül mozognak, és az inaktiváció kialakulásához egyetlen alegység inaktivációs doménjének elmozdulása elegendő [43] [58], addig a C-típusú inaktivációhoz mind a négy alegység hozzájárul, azok együttes mozgása szükséges [59, 60]. A C-típusú inaktiváció az külső kationokra és a csatornapórus aminosav-összetételére érzékeny. Ezt a folyamatot az extracelluláris  $K^+$  koncentráció megemelkedése gátolja [61, 62]. A C-típusú inaktiváció érzéketlen az intracelluláris tetraetilammóniumra (TEA), ugyanakkor a csatorna extracelluláris oldalán alkalmazott TEA a folyamatot gátolja [63] (6. ábra), mivel a csatorna extracelluláris oldalán található ionkötő hely  $K^+$ -mal vagy TEA-val történő kitöltése lassítja vagy megakadályozza a C-típusú inaktivációhoz szükséges konformáció-változásokat [64]. Ezt a jelenséget az ún. „foot in the door” mechanizmussal

közelítik amely jelentősen eltér az N-típusú inaktivációtól, mivel az érzéketlen extracelluláris  $K^+$ -ra vagy TEA-ra [63]. A C-típusú inaktivációban valószínűleg a feszültség-szenzor is szerepet játszik, ez lehet akár a folyamat kiváltója, azáltal, hogy konformációs átrendeződésen megy keresztül. [65-67].



**6. ábra.** TEA gátlása mutáns Shaker csatornán N-terminális delécióval. **(A)** Lassú inaktiváció, 0 mV-ra történő depolarizáció és 30 mM külső TEA hatása outside-out konfigurációban; **(B)** lassú inaktiváció és internális TEA hatása inside-out konfigurációban.

A *Shaker* csatornák lassú inaktivációja két egymás utáni folyamatot foglal magában: a csatorna külső pórúsának kezdeti beszűkülését, ami megakadályozza az ionok áramlását, áramcsökkenést eredményezve, és az azt követő sokkal lassabb szelektivitási filterben bekövetkező konformációváltozást, ami stabilizálja a feszültség-szenzort és a pórust, és töltésbefagyasztást eredményez [66]. Loots és Isacoff javaslata alapján a P-típus kifejezést a kezdeti pórusbezáródásra („pore collapse”), a C-típus kifejezést a csatornának a kapuzási töltésbefagyasztás kezdete utáni stabilizált inaktivált konformációjára használjuk [66]. Sok esetben, ahol a pórus-inaktiváció és a töltésbefagyasztás relatív mértéke nem tisztázott, az összevont P/C-típusú inaktiváció megnevezést használják [65]. A Kv1.3 csatornák inaktivációja kizárólag a lassú, P/C-típusú mechanizmus [68].

Az inaktiváció csökkenti a membránpotenciál-kontrollhoz rendelkezésre álló, aktiválható  $K^+$  csatornák számát. Az inaktivált állapotból a Kv1.3 csatornák még -120 mV membránpotenciál mellett is a Kv1.x csatornákhöz képest sokkal lassabban, hosszú idő alatt (50 s) térnek vissza nyugalmi (zárt) állapotukba, így az aktivált Kv1.3 csatornák jelentős  $K^+$ -fluxust képesek létrehozni, mielőtt a nem-vezető inaktív állapotba kerülnek. A Kv1.3 csatornák e tulajdonságai, valamint a limfociták membránjának rendkívül magas ellenállása (10–20 G $\Omega$ ) biztosítják azt, hogy a T sejtek membránpotenciálját kevés számú ioncsatorna is képes fenntartani [69].

## 2.2.2 A Kv1.3 farmakológiai jellemzése

A nyugvó T sejtek 2-300 Kv1.3 csatornát fejeznek ki a felszínükön. A Kv1.3 általi membránpotenciál szabályozás negatív visszacsatolási mechanizmus szerint történik, mivel a depolarizáció a kapu nyitását,  $K^+$  ionok kiáramlását eredményezi, ami viszont hiperpolarizációval jár, és a kapu bezárását vonja maga után. A Kv1.3 csatornák blokkolásával a sejtek depolarizációja, a timidinbeépülésnek, az IL-2-termelésnek és a proliferációnak a gátlása érhető el. Számos, korábban alkalmazott gátlószer [41, 70-73] pl. a tetraetilammónium vagy a 4-aminopiridin azonban nem bizonyult specifikusnak a Kv1.3 csatornákra nézve. Így ezen csatornák T sejt aktivációban játszott szerepét tisztázandó, új, specifikus, nagy affinitású peptid toxinokra volt szükség, amelyeket később számos állati venomból, elsősorban skorpióméregből izoláltak [74-76]. A *Leiurus quiquestratus* skorpió mérgéből izolált 37 aminosavból álló Charybdotoxin (ChTX) volt az első toxin, ami a feszültségkapuzott kálium és az IKCa1 ioncsatornák specifikus gátlószerének bizonyult. A ChTX nagyságrendekkel nagyobb affinitással gátolta ezeket az ioncsatornákat a korábbi gátlószerekhez képest [77, 78]. A ChTX már nanomoláris koncentrációkban is gátolta a Kv1.3 áramokat, az IL-2-termelést és a T sejt proliferációt. A ChTX azonban a Kv1.3 és az IKCa1 csatornát egyaránt gátolta. Ezt követően fedezték fel a Noxiustoxint és a Margatoxint (MgTX), amelyek Kv1.3-ra nagy szelektivitást mutattak, és hasonlóan a ChTX-hoz depolarizálták a nyugvó T sejteket, gátolták aktivációjukat. Ez a megfigyelés mutatott rá arra, hogy a nyugvó T sejtek membránpotenciáljának a Kv1.3 csatornák a fő meghatározói, és az IKCa1 csatornák membránpotenciálhoz való hozzájárulása elhanyagolható [33, 41]. A MgTX volt az első, amellyel *in vivo* immunszuppressziót értek el, a Kv1.3 csatornák gátlása által [37].

A későbbiekben további nagy affinitású  $K^+$  csatornagátló toxinokat azonosítottak: pl. Kaliotoxin [79], Agitoxin-1, -2, -3 [80], Maurotoxin [81], Heterometrus spinnifer toxin (HsTx1) [82], Pi toxin-1, -2, -3 [75, 76]. Ezek a toxin molekulák dugószerűen tömítik el a csatorna pórusát. A nagy affinitást a toxin és a csatorna közötti nagy érintkező felület magyarázza. A még nagyobb affinitásért a toxinok pozitív töltésű lizin aminosav részletei a felelősek, amelyek a csatorna pórusába nyúlva befolyásolják a transzmembrán elektromos mezőt. Általában egy aromás gyűrű is kapcsolódik a lizinhez, amely a nagy affinitású  $K^+$ -gátlószerek ismertetőjele. A Hanatoxin újabban felfedezett, nagy affinitású toxin, amely nanomoláris koncentrációkban is hat, azonban nem tartalmazza sem a lizin, sem az aromás részletet. Pókméregből izolálták, és nem a megszokott pórusblokkoló mechanizmus szerint

működik: négy Hanatoxin molekula képes egyidejűleg kötődni a feszültségkapuzott  $K^+$ -csatornák pórusrégiójának külső részéhez, ezáltal befolyásolva a feszültségfüggő kapuzást [83].

A toxinok jelentős része bár nagy affinitással kötődik a Kv1.3 csatornához (amelyet a disszociációs állandók pM-nM tartománya is jelez), szelektivitásuk a  $K^+$ -csatornák, és azon belül a Kv1 család tagjai között nem jelentős, így súlyos mellékhatások kockázata nélküli, biztonságos terápiás alkalmazást nem teszik lehetővé. Ehhez olyan toxinokra van szükség, amelyek mutációjával a rokon csatornák közötti apró különbségek célozhatók meg. Ilyen módon növelték meg a tengeri rózsából izolált ShK toxin szelektivitását a Kv1.3 csatornára. A toxin vad típusa eredetileg bár kicsi (pikomoláris) koncentrációban, de számos Kv1 tagot gátolt. A kritikus lizin aminosavat diaminopropionsavra cserélték le (ShK-Dap22). A mutáns toxin ugyan valamivel kisebb effektivitással blokkolta a csatornát vad típusú párjához képest, de szelektivitásban sokkal kiemelkedőbbnek bizonyult. Míg a Kv1.3 csatornát még mindig az alsó pikomólos koncentrációban gátolta a többi Kv csatornára nézve a félhatásos dózis mintegy 1000 - 10 000 szeresére nőtt. Később a toxin potenciális immunszuppresszorként való alkalmazása megkérdőjeleződött, mivel az ShK-Dap22 a heteromultimer Kv1.1 és Kv1.2 csatornákra is blokkolást mutatott, ami a nem kívánt mellékhatások valószínűségét megnövelte.

A peptid toxinok mellett számos kismolekula Kv1.3 gátlószert fedeztek fel, amelyek változatos mechanizmusok szerint kötődnek a csatornához. A kisebb kontaktrégióknak és a kevésbé specifikus kölcsönhatásoknak köszönhetően, ezek a molekulák lényegesen kisebb affinitással és szelektivitással bírnak a Kv1.3 csatornára vonatkozóan, mint a peptid toxinok [84].

### **2.2.3 A Kv1.3 csatornák szervezetszintű eloszlása**

Ez az ioncsatorna a központi idegrendszer és az immunrendszer jellemző feszültségfüggő ioncsatornája, amelynek expresszióját RT-PCR, in situ hibridizáció és immunohisztokémiai technikák, valamint radioaktívan jelölt toxinok segítségével is kimutatták. Ezeken a területeken a Kv1.3 alegységei homo - és a Kv1 család más tagjainak alegységeivel - heteromerekként összeszerelődve alkotnak funkcionális csatornákat. A Kv1.3-at a humán és patkány agy számos területén kimutatták: *colliculus inferior*, *pons / medulla*, *mesencephalon*, *colliculus superior*, *corpus striatum*, *cortex cerebri*, továbbá kimutatták a Kv1.3 csatornák expresszióját a hippocampális gátló neuronokon, patkány

pálcika-bipoláris sejteken a *plexus chorioideus* epithélium sejteken, emellett leírták a Kv1.3 áramok protein kinázokkal történő szabályozását patkány szaglógumó neuronokban is. Megtalálhatók a tüdőben, a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben, a tímuszban, a lépben, a nyirokcsomókban, a mandulában, fibroblasztokban. Ezen felül a Kv1.3 csatorna jelenléte a B- és T-limfociták, progenitor-limfociták, az oligodendrociták és mikroglia sejtek, valamint a makrofágok proliferációjával is korrelál, de fellelhető oszteoklasztokban, vérlemezkékben és a herékben is [85].

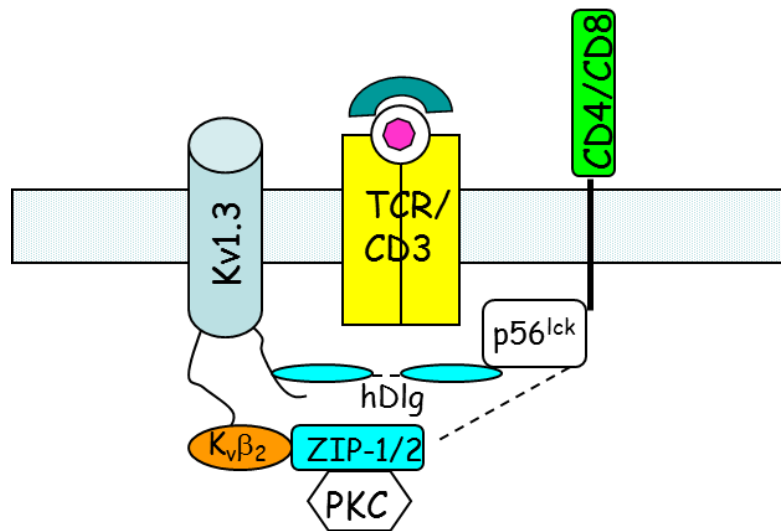
#### **2.2.4 A Kv1.3 poszt szintetikus módosítása**

A  $K^+$  csatornák aktivitása a gátlószerek mellett szabályozható a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek módosításával is. Ez utóbbi történhet fehérje-lipid és fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül, ami magában foglalja az ioncsatornák protein kinázok által történő szabályozását is.

Kimutatták, hogy Jurkat T sejtekben mind a PKA, mind a PKC negatív irányban szabályozza a Kv1.3 csatorna aktivitását, továbbá, hogy a PKC-függő moduláció az előfeltétele a csatorna PKA általi szabályozásának [86, 87]. Ezzel ellentétben humán T sejtekben a PKA és a PKC általi foszforiláció a csatorna aktivitását pozitív irányban szabályozza azáltal, hogy a csatorna egyensúlyi aktivációs és inaktivációs feszültségfüggését módosítja. A Kv1.3 csatornaaktivitás PKC függő - szerin/treonin foszforiláció általi - szabályozását későbbi tanulmányok Jurkat sejtekben is alátámasztották, azonban kimutatták, hogy a PKC- és PKA-mediált szabályozás nagyban függ a csatorna természetes környezetét kialakító fehérjéktől, tehát a szabályozás natív sejtekben jóval érzékenyebbnek bizonyult, míg transzfektált HEK-tsA sejtekben ez a tulajdonság részben elveszett [88].

Kimutatták, hogy a receptor tirozin kinázok aktiválása (pl. epidermális növekedési faktor, inzulin receptor) szuppresszív hatással van a Kv1.3 áramra [89, 90]. T sejtekben azonban a jelátvitel nem-receptor tirozin kináz által mediált, amelyek a TCR/CD3 aktiváció következtében dúsulnak fel, így T sejtekben a Kv1.3 ezen kinázok általi szabályozása nagyobb élettani relevanciával bír. Nem-receptor tirozin kinázok (v-*Src*) és Kv1.3 csatornák egyidejű transzfektálása HEK-tsA sejtekbe a csatornafehérje tirozin foszforilációjában jelentős növekedést mutatott, amely cell-attach patch konfigurációban makroszkópikus áramcsökkenéssel társult [91]. Tirozin foszfatáz inhibitorok alkalmazása (pervanadate) az endogén kinázok általi Kv1.3-foszforilációt növelte, amit ennek megfelelő áramamplitúdó-csökkenés követett. [92]

Ezen felül biokémiai és biofizikai kísérletek egész sora utal arra, hogy a már megismert molekulákon kívül a Kv1.3 ioncsatornák is fontos szereplők az IS kialakulása során létrejött jelátviteli komplexben. Ismert a Kv1.3 csatornák p56<sup>lck</sup> kináz általi szabályozása [93, 94], a Kv1.3 és p56<sup>lck</sup> hDlg (SAP97) adapter fehérjéken keresztüli kapcsolata [95, 96], továbbá a Kv1.3 csatornák járulékos alegységéhez (Kvβ1.2) [97] kapcsolódó egyéb adapter proteineken keresztül (ZIP-1, ZIP-2) a PKC-hez történő asszociáció [98] is ezt a feltételezést támasztja alá. A Kv1.3 csatornák és az immunológiai szinapszis molekulái közötti kapcsolat lehetőségét az a felismerés is támogatta, hogy az említett fehérjék koleszterin és szfingomielin gazdag membrán mikrodoménekhez, ún. lipid raftokhoz asszociálódnak, melyek dinamikusan átrendeződnek a TCR/CD3 komplex aktiválását követően [23, 99-102] (7. ábra).



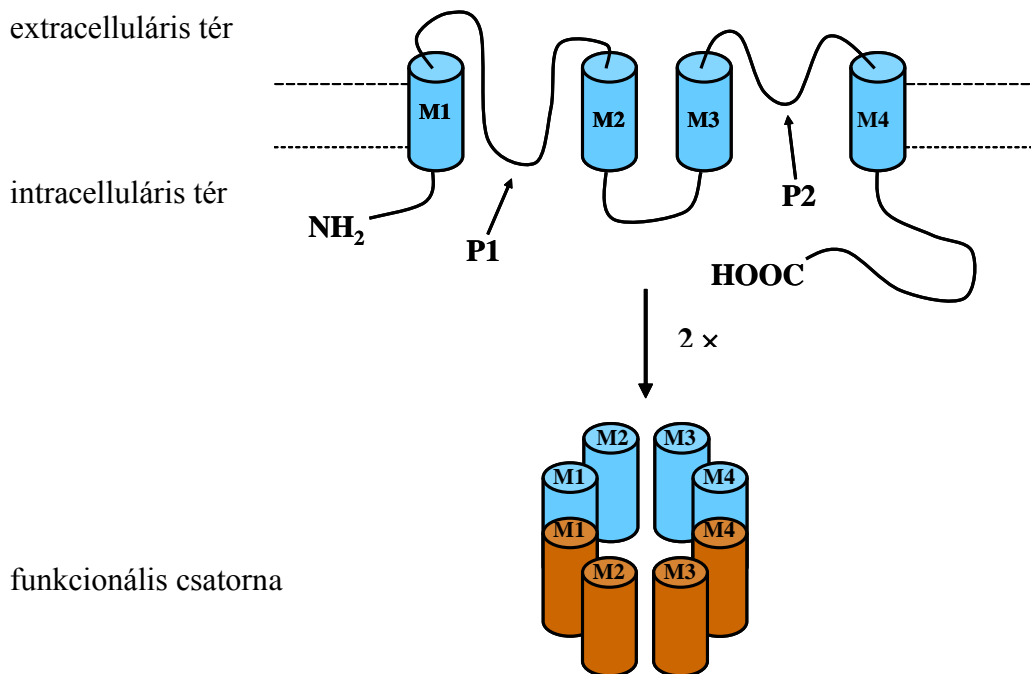
7. ábra. Molekuláris kölcsönhatások az immunológiai szinapszisban

*Mindezek alapján feltételezzük, hogy a csatornák foszforilációs módosítása szabályozza a Kv1.3 ioncsatornák működését, valamint a csatornák IS-beli feldúsulása befolyásolja az IS-ben a jelátviteli folyamatok hatékonyságát. A vonatkozó vizsgálandó kérdéseket a célkutúzés fejezet A pontja tartalmazza (ld. 3. fejezet).*

## 2.3 A kétpórusú $K^+$ -csatornák

### 2.3.1 A kétpórusú $K^+$ csatornák biofizikai jellemzői

A  $K^+$  csatornák családját alkotják a két alegységből felépülő, alegységenként két pórusrégiót (P1 és P2) tartalmazó, ún. kétpórusú  $K^+$  csatornák (8. ábra). Az egyes alegységek a membránt teljesen átívelő négy  $\alpha$ -helikális szegmensből (M1-M4) állnak, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnék össze. A kétpórusú  $K^+$  csatornák szekvenciális azonosság és funkcionális hasonlóság alapján hat alcsoportba osztályozható: TWIK (**T**andem of Pore Domains in a **W**eak **I**nward **R**ectifying  $K^+$  Channel), TREK (**T**WIK-**R**elated  $K^+$  Channel), TASK (**T**WIK-**R**elated **A**cid-Sensitive  $K^+$  Channel), TALK (**T**WIK-**R**elated **A**lkaline pH-Activated  $K^+$  Channel), THIK (**T**andem Pore Domain **H**alothane-**I**nhibited  $K^+$  Channel), és TRESK (**T**WIK-**R**elated **S**pinal Cord  $K^+$  Channel). Az aminosav-szekvencia analízisek csupán 25-40% homológiát mutatnak a családon belüli egyes csatorna-osztályok között, s a csatornák alapvető elektrofiziológiai sajátságai nagymértékben eltérhetnek egymástól.



**8. ábra.** A kétpórusú csatornák feltételezett szerkezete: két alegységből felépülő, alegységenként két pórusrégiót (P1 és P2) tartalmazó  $K^+$  csatornák. Az egyes alegységek a membránt teljesen átívelő négy  $\alpha$ -helikális szegmensből (M1-M4) állnak, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnék össze.

Közös jellemzőjük azonban, hogy a hagyományos peptid (ChTX, MgTX, stb.) és nem-peptid jellegű (TEA, 4-AP)  $K^+$  csatornagátlószerre kis mértékben vagy egyáltalán nem érzékenyek. A csatornák aktiválása a legkülönbözőbb szignálok hatására jöhet létre, melyek közül említést érdemel az intra- és extracelluláris pH módosulása, a membrán telítetlen/telített zsírsavainak arányának megváltozása, valamint a mechanikai feszülés [103, 104]. Feltételezhető élettani szerepük a nyugalmi membránpotenciál kialakításában és fenntartásában van, ezek a csatornák tehetők felelőssé az ún. „szivárgási” áramért. A TWIK-1 (Two-pore Weak Inward Rectifier  $K^+$  channel) volt az első, amelyet sikerült klónozni, és emlős sejtekben expresszálni [105].

Az általunk vizsgált TASK-1 és TASK-3 csatornákra egyaránt jellemző, hogy rendkívül érzékenyek az extracelluláris pH fiziológiás tartományán belül történő, relatíve kis változásokra, mely a szelektivitási szűrő közelében található hisztidin (H89) protonálódásának tulajdonítható [106], de a pH-szenzitivitáshoz két másik aminosav is hozzájárul kisebb mértékben (H72, K210), mindkettő az extracelluláris hurkokon helyezkedik el [107]. Az extracelluláris savasodás  $pK=7,3$  és  $1,6$  Hill koefficiens értékekkel gátolja a TASK-1 csatornát, míg a sejten belüli pH-változások nem befolyásolják a csatornaaktivitást. A gátlás feszültségfüggetlen, ami azt valószínűsíti, hogy a protonszenzor a transzmembrán elektromos mezőn kívül helyezkedik el [108].

Különböző fajoktól függően a TASK-3 55-60%-os szekvenciabeli hasonlóságot mutat a TASK-1 csatornával [106, 109]. A transzmembrán szegmensek, a pórusrégiók és az extracelluláris hurkok nagyfokú hasonlóságot mutatnak, míg a COOH terminusok jelentősebb mértékben térnek el egymástól. A heterológ TASK-3 expressziót időfüggetlen és nem inaktiválódó  $K^+$ -áramként karakterizálták, azonban későbbi elemzések során,  $-80$  mV-ról  $-20$  mV-ra történő depolarizálás útján, humán TASK-3 csatornákon egy kisebb időfüggő áramkomponens is megjelent  $10$  ms-os időállandóval [110]. Inside-out patch konfigurációban,  $140$  mM szimmetrikus  $K^+$ - és  $2$  mM extracelluláris  $Mg^{2+}$ -koncentráció mellett a TASK-3  $K^+$ -áram I-V kapcsolata gyenge, befelé rektifikáló tulajdonságokat mutatott; az egyedi csatorna vezetőképesség  $27$  pS volt  $-60$  mV, és  $17$  pS  $+60$  mV feszültség mellett [109]. A kétértékű kationok extracelluláris térből való eltávolítása után a befelé irányuló rektifikáció (és a negatív feszültségeken létrejövő egységes vezetőképesség) még kifejezettebbé vált [106]. A befelé rektifikáló áram és a feszültségfüggés teljes-sejt szinten és szimmetrikus  $K^+$  mellett a makroszkópos I-V görbét ellentétesen befolyásolja, a nettó áram enyhén kifelé rektifikáló [106].

A TASK-3 a TASK-1 csatornánál kevésbé érzékeny savasodásra, pH=7,4-ig aktív, pK=6,7 és 1,8-2 Hill koefficiens értékeknél gátolt. A TASK-1-hez hasonlóan a H89 hisztidin aminosavmaradék határozza meg elsődlegesen a pH-szenzitivitást [106, 109].

A heteromer alegység-összeszerelődés nagymértékben megnöveli a feszültségfüggő és befelé rektifikáló káliumion csatornák diverzitását, a  $K_{2P}$  csatornacsaládban mindössze a TASK-1 és TASK-3 csatornák bizonyultak funkcionális heterodimereknek [111]. A homodimer TASK-1 és TASK-3 csatornák különböző biofizikai, regulátor és farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A TASK-1/TASK-3 heteromer tulajdonságaiban a TASK-1 homodimerhez hasonló. A polikationos sajátságú ruténium vörös festék és a  $Zn^{2+}$  kationok, amelyek kizárólag TASK-3 homodimer gátlószerek, a heterodimerre és a TASK-1 homodimerre nézve hatástalanok [112-115], más tekintetben a heterodimer a TASK-3 homodimertől megkülönböztethetetlen. Extracelluláris  $Mg^{2+}$  jelenlétében a heterodimer egyedi csatorna vezetőképessége megegyezik a TASK-3 homodimer vezetőképességével (vagyis hozzávetőlegesen kétszer nagyobb a TASK-1 homodimer vezetőképességénél) [116, 117]. A heterodimer bizonyos tulajdonságokat, pl. a pH-szenzitivitást [111] vagy  $Mg^{2+}$ -mentes extracelluláris környezet melletti egyedi csatorna-konduktanciát [117] tekintve átmenetet képezhet a szülő homodimerek tulajdonságai között.

Natív szövetekben a TASK-1/TASK-3 heterodimer összeszerelődése ugyanolyan hatékonysággal történik, mint a homodimereké, amennyiben a két alegység expressziós aránya megfelelő. A TASK-1/TASK-3 heterodimerek 44%-ban felelősek a folyamatos  $K^+$ -kiáramlásért cerebelláris szemcses sejtek [116], 52%-ban a háttér  $K^+$  áramért motoneuronok [118] [119], és 75%-ban a pH-szenzitív  $K^+$ -áramért a patkány carotis test glomus sejtjei esetén [117]. Heterodimereket kimutattak dorzális, laterális, talamokortikális neuronokban [120] és CA1 hippokampális piramis sejtekben [121]. A két TASK alegység heterodimerizációja jelentős eltérést biztosít pH-szenzitivitásban egy átmeneti pK érték körül (a homodimerek pK értéke közötti tartományban).

### **2.3.2 A kétpórusú $K^+$ -csatornák farmakológiája**

Az anandamidot eredetileg nagy specificitású TASK-1 csatorna gátlószerként azonosították a  $K_{2P}$  családon belül [122], ezért az anandamidot és a methanandamidot rutinszerűen alkalmazták natív szövetekben, glomus sejteken [123], simaizom sejteken, tüdő artérián [124] kardiomiocitákon [125] és cerebelláris szemcses sejteken kifejeződő TASK-1 csatornák azonosítására. Azonban egy későbbi tanulmány megcáfolta a specificitást; az

anandamidot és methanandamidot is TASK-1 és TASK-3 gátlószereknek találták különböző fajokban [118, 126, 127], ezért a TASK alcsaládban a (meth)anandamid nem tekinthető specifikus, csatornákat megkülönböztető farmakológiai eszköznek, ellentétben a ruténium vörössel, amely az eddig vizsgált fajokban csak a TASK-3 csatornát gátolta [111, 118], [114], [116, 117]. Érdeemes megemlíteni, hogy hasonló koncentrációkban alkalmazott endocannabinoid származékok a TASK-1 és TASK-3 csatornákat gátolják, azonban más ioncsatornák működését is módosítják, pl. a tetrodotoxin (TTX)-szenzitív Na<sup>+</sup> csatornákat [128], a vanilloid receptort (TRPV1) [129], a T-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornát [130], és a Shaker-típusú K<sup>+</sup> csatornákat is [131, 132].

### 2.3.3 A kétpórusú K<sup>+</sup>-csatornák előfordulása és fiziológiai funkciói

Mivel a TASK-1 csatorna a központi idegrendszer sejtjeiben is expresszálódik, így feltehetőleg fontos szerepet játszik azok nyugalmi potenciáljának kialakításában, befolyásolva elektromos aktivitásukat [104, 133-135]. Arra is fény derült, hogy a klinikai gyakorlatban alkalmazott különböző altató és érzéstelenítő vegyületek (éter, halotán, kloroform) gátló vagy éppen ellenkezőleg, serkentő módon hatnak a TASK-1 csatorna működésére, mely arra utal, hogy valószínűleg ezen ioncsatornán keresztül történik meg az idegrendszer „átmeneti blokkolása” az anesztézia során [136-139]. A halotán aktiválja a savérzékeny TASK-hoz hasonló csatornákat, hiperpolarizálja az azokat kifejező neuronokat, és szünetelteti spontán aktivációjukat [137]. A TASK-1 és TASK-3 csatornákat mRNS szinten az agytörzs kemoreceptív területein, a *locus coeruleus* [137, 140], a szerotonergikus *raphe nuclei* [141] sejtjein mutatták ki, valamint a csatornák jelenlétét és szerepüket az acidózis és hypoxia érzékelésében a carotis test I-es típusú glomus sejtjein is [139]. Számos oxigénszenzitív és feszültségfüggő (Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1) csatorna mellett mRNS és fehérje szinten a TASK-1 csatorna is kimutatható pulmonális simaizom sejtek felszínén, amelyek depolarizációja főleg a hypoxia és hyperkapniás acidózis által előidézett nyugvó káliumion-vezetőképesség gátlásán alapszik [124, 142, 143]. A TASK-1 csatornákat mRNS szinten kimutatták már ízlelőbimbókon is, valamint TASK-1 és TASK-3 csatornákat patkány íz receptor sejteken [144], amelyek a savanyú ízek érzékelésében játszhatnak szerepet. TASK-1 mRNS-t az agytörzs motoneuronjaiban [145] és a gerincvelő ventrális szarván is kimutattak [140]. Hypoglossális motoneuronokban a pH=6,5-re történő extracelluláris savasodás depolarizációt és a pH-érzékeny K<sup>+</sup>csatornagátlást eredményez, amelyek más csatornák mellett a membránpotenciál változásáért felelősek [140]. Bizonyos sejtekben a savasodás által

előidézett depolarizáció elérte azt a küszöbértéket, amely az akciós potenciál kialakulásához szükséges [145]. A TASK-1 mellett később a TASK-3 csatornákat is kimutatták *in situ* hibridizáció útján agyidegek motoros magjaiban [146] és a gerincvelő szomatikus motoneuronjaiban [141]. A savérzékeny  $K^+$  csatornák G-proteinekhez kapcsolt receptorokon keresztül számos neurotranszmitterrel gátolhatók [140, 145]. A TASK-1 gátlása depolarizációt eredményez, amely feltételezhetően a motoros respirációs aktivitást szabályozza [140]. Valójában a motoneuronokon kifejeződő pH-érzékeny áramok aktivációja okozza az anesztézia által kiváltott immobilizációt [137]. Továbbá, a cerebelláris szemcsesejteken kifejeződő TASK-1/TASK-3 heterodimereiről kimutatták, hogy a háttér  $K^+$  konduktancia elsődleges meghatározói *in vivo* [126], míg a TASK-3 homodimerekkel együtt a tenyésztett sejtek áramai nagy részének hozzájárulói [116], továbbá a TASK-3 csatornák részt vesznek a cerebelláris szemcsesejtek akciós potenciáljai tüzelési mintázatának szabályozásában is [147]. Feltételezhető, hogy a TASK-1/TASK-3 heteromerek az orexin neuronok glükóz-aktivált  $K^+$  csatornái. Alacsony szubfiziológias glükózkoncentráció mellett (0,2 mM) a savérzékeny  $K^+$  konduktancia csaknem teljesen szuppresszált, ami az orexin neuronok háttér  $K^+$ -áramainak jelentős mértékű glükózfüggőségére mutat; a csatornák a glükóz által szabályozzák az orexin sejtek inhibícióját [148]. A TASK-1 számottevő mértékben jelen van a szívben is, pitvari és kamrai szövetekben is kimutatták, a TASK-3 csatornával ellentétben, melynek jelenléte elhanyagolható [108, 149, 150]. Kimutatták, hogy a háttér TASK-1 csatorna trombocita aktiváló faktor (PAF) általi gátlása arrhythmogén hatásokat eredményezhet [151]. A TASK-1 csatornák szerepét patkány kamrai kardiomiociták repolarizációjában valószínűsítették [150], valamint az a feltételezés is előtérbe került, hogy az  $\alpha_1$ -adrenergikus receptorok stimulációját követő TASK-1-áram gátlás acidózisban és/vagy szimpatikus aktiváció során befolyásolja az akciós potenciál időtartamát [150]. E mellett a mellékvesében is kimutatták a kétpórusú  $K^+$  csatornák jelenlétét. A mellékvesekéreg glomerulóza sejteinek erősen negatív nyugalmi membránpotenciáljáért döntően a háttér  $K^+$  permeabilitás felelős. Ezek közül a csatornák közül a TASK-3 csatornák fejeződnek ki a legjelentősebb mértékben a glomerulóza sejtekben, míg a TASK-1 csatornák az egész mellékvese kéregben egyenletes eloszlást mutatnak [152-154]. Patkány mellékvese glomerulóza sejtekben kimutatták, hogy az angiotenzin II a  $K^+$  permeabilitásán keresztül depolarizálja a glomerulóza sejtet, továbbá azt, hogy a TASK csatornák gátlása döntő szerepet játszik az aldoszteron kiválasztás szabályozásában is [133].

A T sejt aktiváció során a limfociták káliumion csatornái játszanak kulcsszerepet a negatív membránpotenciál stabilizálásában és a  $Ca^{2+}$ -beáramlás hajtóerejének fenntartásában,

fokozásában. Újabb tanulmányok azonban azt sugallják, hogy az aktivált effektor T limfocitákban a domináns feszültségfüggő Kv1.3 és a Ca<sup>2+</sup>-aktivált IKCa1 csatornák mellett a TASK-1 és TASK-3 csatornák is részt vesznek az immunválaszban. Meuth és munkatársai valószínűsítik, hogy a TASK csatornák K<sup>+</sup>-effluxhoz való hozzájárulása akár 40%-os is lehet. CD3<sup>+</sup> T limfocitákon kimutatták a TASK-1 és TASK-3 immunreaktivitását, valamint azt, hogy ezeknek a T sejteknek a proliferációja és interferon- $\gamma$  termelése TASK csatornagátlószer alkalmazása mellett szignifikánsan lecsökkent [155].

A TASK-3 csatornáról megállapították, hogy az a sejt életképességet jelentősen befolyásolhatja. Bizonyos körülmények között apoptózist indukál, más körülmények között a proliferációt segíti elő. Erre példa, hogy az agy korai fejlődése alatt a szemcsesejtek jelentős része apoptotizál, amely a megfelelő cerebelláris struktúra kialakulásának feltétele. Az apoptózis folyamata egybeesik a TASK-3 csatornák megjelenésével. Az érett szemcsesejtek, amelyek szintén expresszálnak TASK-3 csatornákat *in vitro* körülmények között, fiziológias K<sup>+</sup>-koncentráció mellett szintén apoptotizálnak [156]. Bizonyos sejteknél, különösen a neuronoknál a csökkent intracelluláris K<sup>+</sup>-szint apoptotikus szignálként jelenik meg, így az extracelluláris K<sup>+</sup>-koncentráció növelésével a szemcsesejtek apoptózisa elkerülhető [157]. Ugyanezt a hatást érték el *in vitro* TASK-3 csatornák farmakológiai gátlásával vagy mutáns TASK-3 csatornák transzfekciójával [156]. A másik fontos jelenség, hogy a TASK-3 gén 5-100-szoros overexpressziót mutat malignus sejteken. Ez a fokozott mértékű expresszió kb. 44%-os az emlő-, 35%-os a tüdőkarinóma eseteiben, így a csatorna potenciális szereplőként merül fel a karcinogenezisben és tumorok progressziójában [158]. A gyomor karcinóma sejtekben a TASK-3 expressziós szint nem tér el számottevően az egészséges gyomornyálkahártyától [159], de a TASK-3 immunofluoreszcens jelölése a membrán helyett a citoplazmában mutat diffúz eloszlást [160]. Tehát az is elképzelhető, hogy a nem plazmamebrán lokalizáció is elősegítheti a malignus elváltozások kialakulását [132].

## **2.4 A regulátor T sejtek és az autoimmunitás**

Akárcsak a B sejtek, a T sejtek többsége is nyugvó állapotban kering a perifériás nyirokszervek között. Az aktiválódás a T sejtek esetében is a G<sub>0</sub>-fázisból a sejtciklusba való belépést jelenti, amelynek egyes szakaszai a megfelelő gének illetve sejtfelszíni molekulák expressziójával jellemezhetők. A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T sejtek, melyeket „regulátor” (regulatory) T sejteknek (T<sub>reg</sub>) neveznek, kritikus szerepet játszanak a saját szövetek iránti immuntolerancia fenntartásában, az autoimmun folyamatok visszaszorításában. A T<sub>reg</sub> sejtek száma és

aktivitása fiziológias körülmények megváltozásához köthető [161, 162]. A  $T_{reg}$  sejtek gátolhatják a T sejt immunválaszt sclerosis multiplex [163, 164], 1-es típusú diabétesz [165, 166] és más autoimmun betegségek esetén. Ugyanakkor a megnőtt csatornaszám és felerősödött csatornafunkció elősegíthetik a tumorok progresszióját is [167, 168].

Kezdetben a  $T_{reg}$  sejteket kizárólag az interleukin-2 receptor  $\alpha$ -láncának expressziójával azonosították (CD25) [169, 170], de később a FoxP3 transzkripciós faktor jelenléte bizonyult a T sejtek ezen alcsoportjának legspecifikusabb markerének [171, 172]. Mivel a FoxP3 egy intracelluláris marker, jelölése a sejtmembrán permeabilizációját igényli. Ez számos élettani vizsgálatot tett körülménnyé. Újabban azonban kimutatták, hogy a sejt felszíni CD127, ami a heterodimer IL-7 receptor része, regulátor T sejteken negatív irányban szabályozott, és a  $CD25^{magas}CD127^{alacsony/-}$  expressziós szint jól korrelál a FoxP3-mal [173]. A T sejt aktivációja után a CD127 receptor minden humán T sejtben negatív irányba szabályozott, de az effektor és memória T sejtek nagy részében újra kifejeződik mindaddig, amíg a FoxP3<sup>+</sup> T sejtek  $CD127^{alacsony}$ -ak maradnak [174, 175].

Mivel a  $T_{reg}$  sejtek kritikus szerepet játszanak az immunrendszer működésében, tumoros és autoimmun betegségek szabályozásában, így mára egyre inkább előtérbe kerülnek terápiás célpontokként. Nagy jelentőségűek lehetnek azok a kezelések, amelyek a jövőben szelektíven tudnák a  $T_{reg}$  sejtek funkcióit stimulálni autoimmun betegségekben vagy gátolni azokat tumoros megbetegedések esetén [176, 177].

## 2.5 Az ioncsatornák szerepe autoimmun betegségekben

Számos betegség az ioncsatornák nem megfelelő működésére vezethető vissza. Ezeknek a betegségeknek a nagy része veleszületett, különböző szív, vázizom és idegrendszeri rendellenesség, amelyet gyakran a csatornafehérjében bekövetkezett egyszerű pontmutáció eredményez. Ide tartozik többek között a „long QT” szindróma, továbbá az izommerevség (myotonia). A paralízis és epilepszia különböző fajtái is ebbe a csoportba sorolhatók. Az ioncsatornákat érintő betegségek másik csoportja szerzett, amely az immunrendszer nem megfelelő működésének eredménye.

A myasthenia gravis volt az első, amelyet autoimmun csatorna-rendellenességként azonosítottak [178, 179], később számos antitest-mediált autoimmun elváltozást írtak le, ilyen pl. a Lambert-Eaton myasthenia szindróma [180], az Isaac szindróma [181], a Morvan szindróma [182] valamint a limbikus encephalitis [183]. Ezekben az állapotokban feszültség- vagy ligandkapuzott ioncsatornák válnak autoantitestek célpontjaivá. Ez a plazmamembránon

keresztül csökkent ionáramlást eredményez, ami az ideg- és izomsejtek ingerelhetőségét kedvezőtlenül befolyásolja.

Ezzel szemben, vannak olyan autoimmun megbetegesések is, amikor az ioncsatornák állnak a „támadó oldalon” vagyis pl. effektor sejtek felületén fejeződnek ki, és ily módon vesznek részt az autoimmun reakcióban. Bár az immunsejtek mindegyike fejez ki ioncsatornákat, az effektor memória T sejtek azok, amelyek a sclerosis multiplex, az 1-es típusú diabetes mellitus vagy a rheumatoid arthritis autoimmun megbetegedések pathogenezisében kritikus szerepet játszanak. Ezeknek az effektor memória T sejteknek jellegzetes csatornamintázata van, amely megkülönbözteti őket más T sejt alpopulációtól [184], a Kv1.3 csatornákat nagy számban fejezik ki. Ez a specifikus csatorna-expressziós mintázat teszi lehetővé a csatornák gátlásán keresztüli sejt alpopuláció szelektív manipulálását. Így tehát feltételezhetően anélkül lehet a káros reakciókat visszaszorítani, hogy az immunrendszer más folyamatainak működését veszélyeztetnénk.

## **2.6 A Sclerosis multiplex és az autoimmunitás**

A sclerosis multiplex (SM) olyan szisztémás autoimmun megbetegedés, amelynek eredményeként a központi idegrendszerben gyulladásos léziók jönnek létre, ami az idegrostok és az azokat védő mielinhévely károsodásához vezet. Ennek következtében különböző mértékű idegrendszeri zavarok lépnek fel. A betegség folyamán az idegrendszer állandó gyulladásban van. Az idegrendszert alkotó legfontosabb sejtek az idegsejtek és az idegrostokat körülvevő mielint képző sejtek, amiket a központi idegrendszerben gliasejteknek hívnak. A gyors és pontos jelátadás a finom és gyors, koordinált mozgások feltétele. Az SM-nél elvész ez a képesség, mivel ilyenkor a gyulladás miatt a mielin elpusztul, a helye heggel gyógyul. A betegség nevében a sclerosis latinul megkeményedést jelent. A gyulladások és hegek az idegrendszerben egyszerre több helyen is kimutathatók, erre utal a multiplex jelző. Az SM hasonlóan a reumatoid arthritishez, nőkben gyakrabban fordul elő. A betegség kialakulásában genetikai tényezők, köztük az MHCII termékek szerepét igazolták. A kórkép kialakulását befolyásoló környezeti tényezőket még nem sikerült azonosítani. A gyulladásos léziókban makrofágok és CD4<sup>+</sup> T limfociták mutathatók ki.

## 2.7 A Kv1.3 csatorna az immunológiai szinapszisban és autoimmun betegségekben

Nicolaou és munkatársai kimutatták, hogy a Kv1.3 csatorna immunszinapszisban történő felhalmozódása a sejtfelszíni csatornák membránbeli laterális mozgása révén jön létre. Továbbá, hogy a Kv1.3 szinapszisban történő lokalizációja a T sejt APC-vel történő kölcsönhatását követő  $Ca^{2+}$ -jelátvitelt Jurkat T sejtekben befolyásolja. Az endogén Kv1.3 csatornák extracelluláris antitestek általi keresztkötése gátolja a csatornák mobilitását, a szinapszisba való feldúsulását, valamint a fehérjeszintézis gátlása nem befolyásolja a csatornák IS-ban való feldúsulását, vagyis az újonnan szintetizált Kv1.3 csatornák nem dúsulnak fel a két sejt közötti kontaktrégióban. Kimutatták, hogy a Kv1.3 szinapszisbeli lokalizációja a  $Ca^{2+}$ -választ módosítja. A keresztkötött Kv1.3 csatornák blokádjának szinapszisba való vándorlása jelentősen megnövelte az anti-CD3/anti-CD28 ellenanyagokkal bevont felületű gyöngyök által kiváltott  $Ca^{2+}$ -válasz amplitúdóját, amely a szinapszis kialakulását idézi elő. Antigénprezentáció hatására bekövetkező Kv1.3 csatornák a plazmamembránmenti szinapszisba történő lokalizációja fontos a  $Ca^{2+}$ -válasz amplitúdójának szabályozása szempontjából, és ennek a folyamatnak a megszakítása magyarázhatja további a  $Ca^{2+}$ -függő szignalizációs események módosítását is.

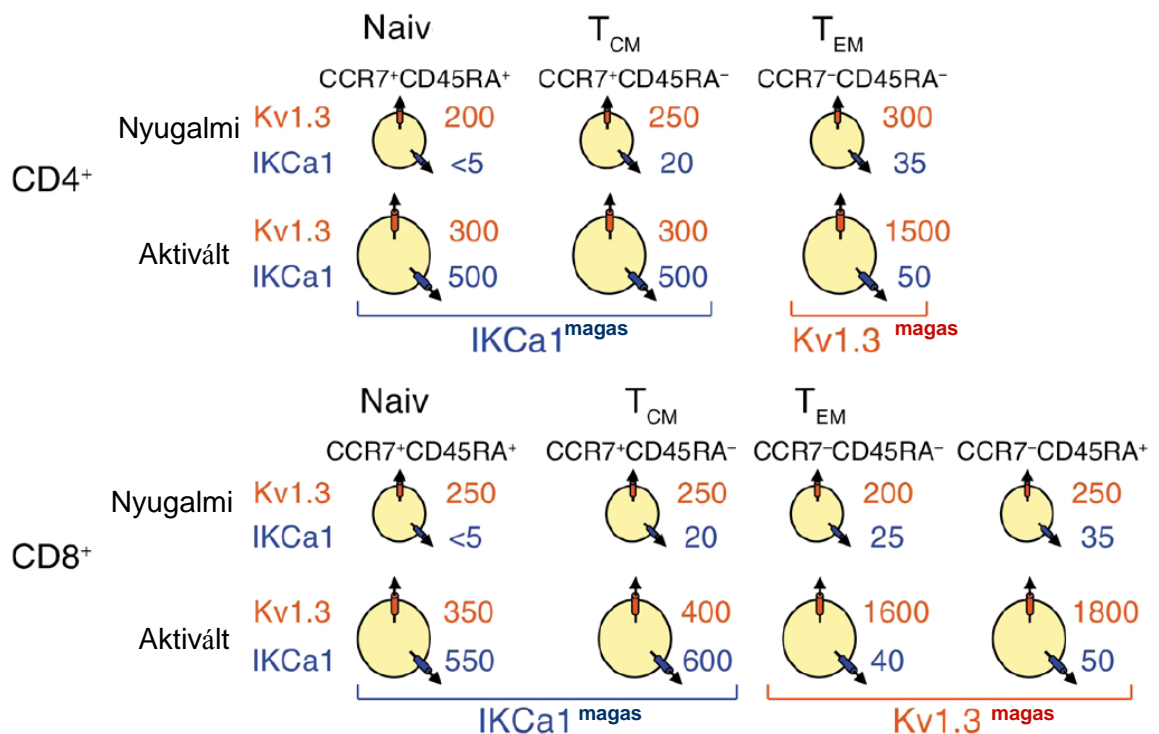
A megváltozott Kv1.3 lokalizáció fontos pathofiziológiai következményekkel is bírhat. A  $Ca^{2+}$  kulcsszerepet játszik a transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozásában, amelyek a citokintermelést és proliferációt is irányítják. A  $Ca^{2+}$ -válasz amplitúdója és időtartama meghatározza a transzkripciós faktor-aktivitás specificitását, így a génexpresszió mintázatát. Nicolaou és munkatársai beszámoltak arról, hogy Kv1.3 csatornák mozgása megváltozik szisztémás lupus erythematosus-ban (SLE) szenvedő betegektől származó T sejteken, és a csatornák szinapszisban való időtartama jelentősen lerövidül az egészséges körülményekhez képest [185]. Az SLE-s T sejtekben kimutatták, hogy a  $Ca^{2+}$ -jelátvitel sokkal kifejezettebb, és tovább fenntartott, hasonlóan a nagyobb mértékű NF-AT vándorláshoz. Ezek a megfigyelések alátámasztják azt a feltételezést, hogy a nem megfelelő mértékű Kv1.3 lokalizáció hozzájárulhat a hiányos  $Ca^{2+}$  jelátvitelhez ezekben a betegeknél [186].

## 2.8 A Kv1.3 csatornák gátlószerei specifikus immunszuppressziót okozhatnak

A T limfociták két jellemző kálium ioncsatornája a Kv1.3 valamint az IKCa1. Az előbbi depolarizáció hatására nyit ki kb. -50 mV küszöbfeletti feszültség felett, míg az utóbbi esetében az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint megemelkedése ( $K_d \approx 200$  nM) eredményezi a csatorna

aktivációját. Mindkét ioncsatorna szelektív a kálium ionra, s megközelítőleg azonos egyedi csatorna-konduktanciával rendelkeznek. Specifikus és nagy affinitású gátlószerek nem azonosak, így akár immunszuppresszió is elérhető az egyik kálium ioncsatorna-populáció szelektív blokkolásával.

A különféle autoimmun betegségek, mint pl. sclerosis multiplex, reumatoid arthritis, 1-es típusú diabétesz mellitusz esetében a betegség pathogenezisében az autoreaktív effektor memória T sejtek játszanak szerepet ( $CCR7^-$ ,  $CD45RA^{+/-}$ ). A naiv T sejtek, egy adott antigén stimuláció hatására differenciálódnak centrális memória T sejtekké ( $T_{CM}$ ), majd további antigén stimulust követően  $T_{EM}$  sejtekké. Chandy és munkatársai kimutatták, hogy az említett betegségekben szenvedő páciensekben az aktivált, beteg szöveti környezetből izolált effektor memória T sejtekben a Kv1.3 expresszió sokkal magasabb, mint a naiv és centrális memória T sejtekben (kb. 1500/sejt) [184] (9. ábra). Ezzel szemben az IKCa1 csatornák száma sokkal alacsonyabb az aktivált  $T_{EM}$ -ben, mint az utóbbi kettőben. Továbbá, a naiv ( $CCR7^+CD45RA^+$ ) és centrális memória T sejtek ( $T_{CM}$ ;  $CCR7^+CD45RA^-$ ) esetén a mitogénindukált proliferáció a Kv1.3 csatornák expressziójának enyhe (kb. 250/sejt  $\rightarrow$  400/sejt) ugyanakkor az IKCa1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával (8-10/sejt  $\rightarrow$  500/sejt) jár együtt.



9. ábra. Átlagos, sejtenkénti Kv1.3- és IKCa1- csatornaszám nyugvó és aktivált  $CD4^+$  és  $CD8^+$  centrális és effektor memória T sejt alpopulációkon.

Azaz a  $T_{EM}$  sejtek, valamint a nyugalomban lévő összes említett T sejt membránpotenciálját döntően a Kv1.3 ioncsatornák szabályozzák, míg a naiv és  $T_{CM}$  T sejt alpopulációban az IKCa1 a domináns. A Kv1.3 nagy affinitású gátlószerei (pl. ShK toxin, IC $\sim$ 100 pM [187]) a  $T_{EM}$  sejtek osztódását specifikusan gátolták, ugyanis a Kv1.3-blokkolás mediált proliferáció-gátlás alól a nyugvó (naiv) és  $T_{CM}$  sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek. A Kv1.3 csatorna szelektív gátlásával  $T_{EM}$  sejtek aktivációja gátolható, immunszuppresszió érhető el.

*A 2.4-2.8 fejezetek alapján felemerül a kérdés, hogy a SM-ben szenvedő betegek regulátor T sejtjei rendelkezne-e valamilyen specifikus ioncsatorna expresszió mintázattal, és esetleg ezen csatornák funkciójának módosításával befolyásolható-e a betegség lefolyása. A humán T limfociták ioncsatornáit, különösen a Kv1.3 és a IKCa1 csatornákat, széleskörűen vizsgálták, és karakterizálták korábbi tanulmányok során [31, 41, 78] de egészen mostanáig nem közöltek olyan tanulmányt, amelyben SM betegek  $T_{reg}$  sejtjeinek csatornamintázatával foglalkoztak. Tanulmányunkban csatornamintázatbeli különbségeket kerestünk, amely lehetőséget nyújthat a T sejtek e fontos alcsoportjának szelektív manipulálására. A vonatkozó vizsgálandó kérdéseket a célkutatás fejezet B pontja tartalmazza (ld. 3 . fejezet).*

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleti munkám két fő irányvonalat képviselt:

- A. A Kv1.3 ioncsatornák tanulmányozása az immunológiai szinapszisban
- B. Sclerosis multiplexes betegek véréből izolált regulátor T sejtek ioncsatorna-expressziós vizsgálata

Munkám során az alábbi célokat tűztük ki:

A.

1. Az általunk használt D10 egér  $T_H2$  sejtvonal  $K^+$  áramainak karakterizálása, biofizikai jellemzése (egyensúlyi és kinetikai paraméterek meghatározása) és farmakológiai vizsgálata specifikus gátlószer alkalmazásával.
2. Egy antigénprezentáló sejt (APC) – T sejt modellrendszer beállítása az immunológiai szinapszis tanulmányozására.
3. Immunfluoreszcens jelölés segítségével a Kv1.3 ioncsatornák vizsgálata az immunológiai szinapszisban.
4. Nyugalomban és szinapszisban lévő D10 sejtek  $K^+$ -áramainak egyensúlyi és kinetikai jellemzőinek összehasonlítása.
5. Protein kináz gátlószer alkalmazásával a csatornák átrendeződését szabályozó tényezők meghatározása, valamint annak vizsgálata, hogy a Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszisba rendeződése milyen funkcionális következményekkel jár.

B.

Célunk volt továbbá a regulátor T sejtek ( $T_{reg}$ ) ioncsatorna-expressziós mintázatának vizsgálata, vagyis annak a meghatározása, hogy ez a speciális T sejt alpopuláció rendelkezik-e speciális ioncsatorna mintázattal, valamint, hogy különbözik-e az egészséges és az autoimmun betegségben szenvedő donorok  $T_{reg}$  illetve naiv T sejteinek ioncsatorna mintázata.

## 4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Sejtek

A D10 egér T<sub>H</sub>2 sejteket, melyek a GFP-vel konjugált PKC- $\theta$  enzimet stabilan expresszálják, Click's médiumban tenyésztettük, amely 10% főtális borjú szérumot, 1% Glutamint, 1% Penicillin/Streptomycin-t, 1% Piruvátot, 50 $\mu$ g/ml Gentamicin-t,  $\beta$ -merkaptotoethanol és 25 mg/L adenzint, citozint, guanozint, uridint tartalmazott. A sejtek G418 rezisztensek voltak. A sejtvonalat Abraham Kupfer és munkacsoportja adományozta (Johns Hopkins University, Baltimore), melyet retrovírusos infekcióval állítottak elő.

A CH12-LX egér B sejteket DMEM médiumban tenyésztettük, amely a következő adalékanyagokat tartalmazta: 10% főtális borjú szérum, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Piruvát, 50 $\mu$ g/ml Gentamicyn,  $\beta$ -merkaptotoethanol és 25 mg/L adenzin, citozin, guanozin, uridin.

A HEK tsA 201 sejtek tápoldata 10% főtális borjú szérumot, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin-t tartalmazott. A transzfekciókat 2  $\mu$ g pRC/CMV és 0,2  $\mu$ g pEGFP-C<sub>1</sub> plazmidok egyesítésével végeztük, Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 reagens felhasználásával. Az EGFP pozitív sejtek áramait 24 órával a transzfekció után regisztráltuk.

A humán perifériás limfocitákat egészséges önkéntesektől és sclerosis multiplexben szenvedő betegektől nyertük. A mononukleáris sejteket Ficoll-Hypaque sűrűség alapú centrifugálással szeparáltuk, majd foszfát alapú pufferben (PBS) mostuk.

### 4.2 Betegek

A humán perifériás limfocitákat 6 sclerosis multiplexes betegből és 9 egészséges önkéntesből izoláltuk. A betegek klinikai jellemzőit a 2. táblázatban foglaltam össze. A sclerosis multiplexes betegek átlagéletkora  $33,7 \pm 3,4$ , míg az egészséges donoroké  $32,4 \pm 2,1$  év volt.

A humán vérminták felhasználásához szükséges engedély száma: DE OEC Rkeb/Ikeb 2790-2008

Beteg	Kor	Nem	SM típusa	SM időtartama (év)	EDSS
1.	43	Nő	PPMS	3	3,5
2.	22	Nő	CIS	<1	2
3.	42	Nő	RRMS	<1	2
4.	24	Nő	RRMS	<1	1,5
5.	30	Nő	RRMS	<1	1,5
6.	41	Nő	RRMS	<1	2

**2. táblázat.** A tanulmányba bevont sclerosis multiplexes betegek adatai. EDSS: Kurtzke's expanded disability status scale (tízfokozatú skála); PPMS: primary progressive MS; RRMS: relapsing remitting MS; CIS: clinically isolated syndrome. Az SM időtartama: a diagnózistól a tanulmány kezdetéig eltelt idő.

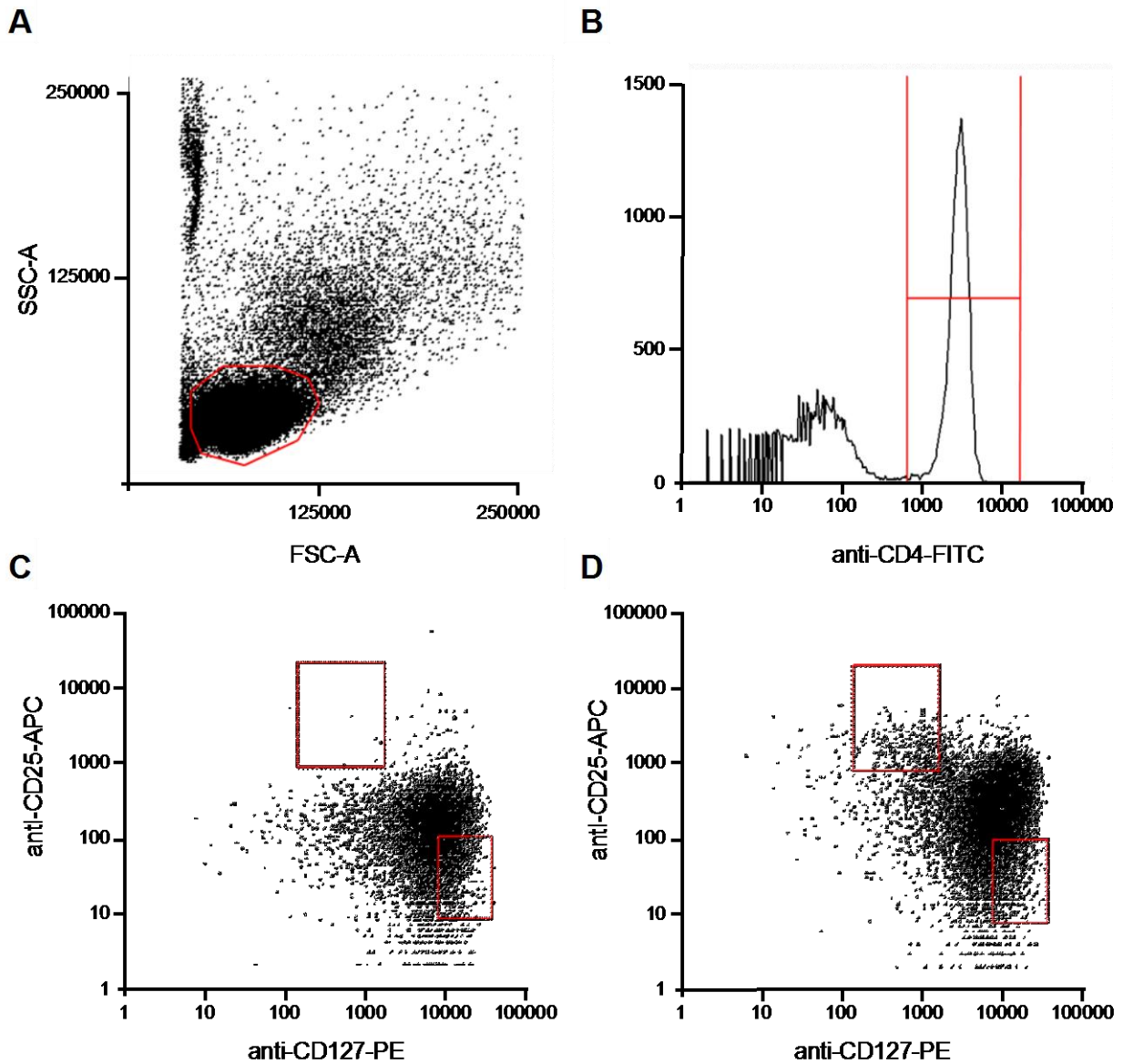
### 4.3 Áramlási citometria

A humán perifériás limfocitákat a következő, egérben termeltetett fluoreszcens festékekkel konjugált antitestekkel jelöltül 30 percig jégen: anti-CD4 – FITC, anti-CD127 – PE (Becton Dickinson, Pharmingen) és anti-CD25 – APC (Invitrogen). Az áramlási citometriás sejtválasztást FACSVantage SE – DiVa berendezéssel végeztük. A fluorofórok gerjesztése 488 nm-en Argon-ion lézerrel, 532 nm-en dióda pumpás szilárd lézerrel és 633 nm-en HeNe lézerrel történt. A fluoreszcenciás detektálási csatornákhöz a következő szűrőket használtuk: 530/30 BandPass (FITC), 585/42 BP (PE), 650 Long Pass (APC). A szeparált sejtek a további elektrofiziológiai mérésekhez extracelluláris oldatba kerültek életképességük fenntartása érdekében, melynek összetétele: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES volt (pH=7,35; 305 mOsm).

#### 4.3.1 CD4<sup>+</sup> regulátor és naiv T sejtek szeparálása

Az egészséges egyénektől, és a sclerosis multiplexes betegektől származó perifériás limfociták populációit áramlási citometriával választottuk szét elektrofiziológiai méréseinkhez. A sejteket CD4, CD25 és CD127 sejtfelszíni markerek alapján különböztettük meg. A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>magas</sup>CD127<sup>alacsony</sup> sejteket tekintettük regulátor, míg a

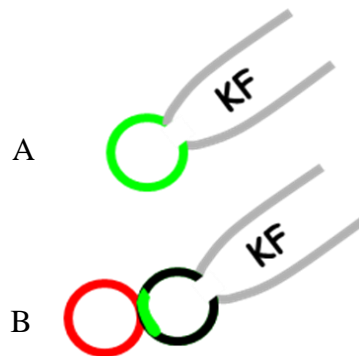
CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alacsony</sup>CD127<sup>magas</sup> sejteket naiv T sejteknek. Mivel a patch-clamp mérések egyedi sejt szinten történnek, a sejtek szétválasztása során nagy hangsúlyt fektettünk a populációk homogenitására, hogy a más fenotípusok általi szennyezéseket minimálisra csökkentsük. Így a T<sub>reg</sub> sejteket 0,8-3%-os, míg a naiv sejteket 6-10%-os határfokkal választottuk ki a CD4<sup>+</sup> populációból a korábban leírt 7-8% és 70-80%-os határfokokhoz képest [173] [188] (10. ábra).



**10. ábra.** Regulátor T sejtek kapuzási stratégiája. Először a teljes T sejt populációt választottuk ki az előre és oldalra szórási tulajdonságok alapján (A), majd a populációt CD4<sup>+</sup> sejtekre szűkítettük le (B). A CD4<sup>+</sup> T sejteket anti-CD4-FITC/anti-CD127-PE antitestekkel jelöltük, amelyeket negatív kontrollként használtunk a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>magas</sup>CD127<sup>alacsony</sup> regulátor és CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alacsony</sup>CD127<sup>magas</sup> naiv T sejtek kapuzási paramétereinek beállításához (C). Az így beállított kapukat ez után az anti-CD4-FITC/anti-CD127-PE/anti-25-APC fluoreszcens festékekhez konjugált ellenanyagok által jelölt minták szelektálására használtuk (D).

#### 4.4 Az immunológiai szinapszis létrehozása

Az egér D10 T<sub>H</sub>2 sejt vonalat, mely a tojásfehérje conalbumin antigénre specifikus, antigénfelismerő sejtként, míg a CH12-LX B sejteket antigénprezentáló sejtként használtuk. A CH12-LX sejteket egy éjszakán át 500 µg/ml conalbuminnal kezeltük. Mind a CH12-LX, mind a D10 sejteket Click's médiummal mostuk, majd a sejtkoncentrációt 1×10<sup>6</sup> sejt/ml-re állítottuk be. A T és B sejteket 1:1 arányban kevertük, 5×10<sup>5</sup> T és 5×10<sup>5</sup> B sejtet 1 percre, 37 °C-on, 200 g-n centrifugáltuk. Az elektrofiziológiai mérésekhez a pelletet extracelluláris oldatban szuszpendáltuk, majd 5 perc 37 °C-on történő inkubálás után 35 mm-es Petri csészékbe pipettáztuk. A D10 sejtek és egyben a szinapszis azonosítása a PKC-θ GFP fluoreszcens jele alapján történt, amely egyedülálló sejtben egész sejtre kiterjedő diffúz jelet adott, míg szinapszisban lévő sejtben az antigén bemutató sejtrel való kontaktrégióba rendeződött át. A B sejteket a szinapszis létrehozása előtt Cell Tracker Red<sup>TM</sup> membránpermeábilis fluoreszcens reagenssel jelöltük meg, a könnyű megkülönböztetés céljából (11. ábra).



**11. ábra.** (A) Teljes-sejt áram mérése egyedülálló és (B) immunológiai szinapszisban lévő T sejtben kálium-fluorid (KF) alapú belső oldat alkalmazásával.

#### 4.5 Immunhisztokémia és konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

A szinapszis kialakítását követően a konjugátumok D10 sejteit poli-L lizines fedőlemezekre 3,75% formaldehiddel való fixálás után jelöltük. A sejteket extracelluláris Kv1.3-ellenes elsődleges (rabbit anti-mouse Kv1.3, Sigma-Aldrich Kft. Hungary) antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on, majd Cy3-konjugált másodlagos (donkey anti-rabbit, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) antitesttel egy órán át. A sejt-konjugátumokról

készült felvételeket Olympus FV1000 típusú konfokális mikroszkóppal készítettük. A PKC- $\theta$  izoformához konjugált GFP gerjesztése 488 nm-en Argon-ion lézerrel, míg a Cy3 gerjesztése 543 nm-en HeNe lézerrel történt. A fluoreszcens detektálási csatornákhöz a következő szűrőket használtuk: 515/15 BandPass (GFP) és 605/50 BP (Cy3).

#### 4.6 Anyagok

A kísérletekben használt vegyszereket az alábbi forrásokból szereztük be:

- Tetraetilammónium (TEA): Sigma-Aldrich Ltd., Hungary
- MgTX: Alomone Labs, Israel
- ChTX: Alomone Labs, Israel
- Anandamid: Sigma-Aldrich Ltd., Hungary
- Ruténium vörös: Sigma-Aldrich Ltd., Hungary
- H89: Sigma-Aldrich Ltd., Hungary
- GF109203X: Sigma-Aldrich Ltd., Hungary
- Damnacanthal: Merck Ltd., Hungary

<b>Toxin</b>	<b>Kv1.3 (<math>K_d</math>)</b>
Tetraetilammónium	10 mM
Margatoxin	100 pM
Charybdotoxin	3 nM

**3. táblázat.** Tetraetilammónium, Margatoxin, és Charybdotoxin Kv1.3 csatornára vonatkozó egyensúlyi disszociációs állandója ( $K_d$ ) [189].

#### 4.7 Sejtek kezelése protein kináz gátlószerekkel

A D10 sejteket 37 °C-on a következő protein kináz inhibitorokkal kezeltük: 0,1  $\mu$ M H89, inkubálás: 3 óra; 0,5  $\mu$ M GF109203X és 1  $\mu$ M Damnachantal, inkubálás: 1 éjszakán át. Minden reagenst dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottunk fel, és adtuk a tenyésztő folyadékhoz.

## 4.8 Elektrofiziológia

A kísérletes munka nagy része patch-clamp technikán alapult [190]. A méréseket ún. teljes-sejt (whole-cell) vagy outside-out konfigurációban végeztük (12. ábra). A teljes-sejt modell lényege, hogy az üvegpipetta és a sejtmembrán között létrejövő nagy ellenállású kontaktust (giga-seal) hozunk létre, majd a giga-seal kialakulása után a pipetta alatti membránt rövid ideig tartó vákuum impulzus alkalmazásával átlukasztjuk, s így hozzáférhetővé válik a sejt belseje. Ilyenkor az egész sejtmembránon, ténylegesen a sejtmembránban elhelyezkedő összes ioncsatornán átfolyó áram mérhető, és jól tanulmányozható például az aktiváció feszültségfüggése vagy az inaktivációs kinetika. Az outside-out konfiguráció annyiban különbözik a teljes-sejt konfigurációtól, hogy a giga-seal és a membrán átlukasztása után az elektródot óvatosan felemeljük, ezáltal egy kis membrán darabot kiszakítunk. A továbbiakban ezen a membrán felületen áthaladó áramot mérjük.

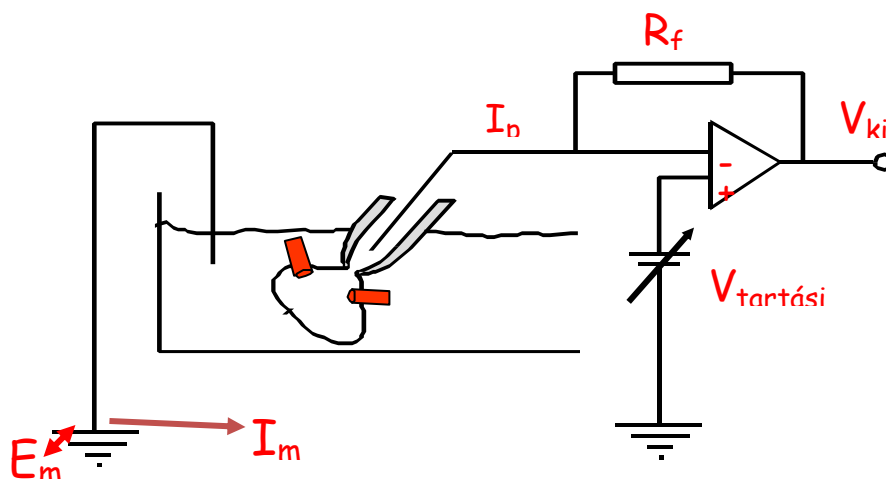
Méréseinkhez Axopatch 200B és 200A patch-clamp erősítőket használtunk feszültségzár üzemmódban [190]. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált sejt membránpotenciálját konstans értéken tartjuk, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagyságát meghatározzuk. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést személyi számítógép vezérelte Digidata 1200, 1322A vagy 1440 illesztőegységen keresztül a pCLAMP programcsomag segítségével (8.0 - 10.0 verzió). Méréseink során szükség esetén soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk egészen 85 %-ig a soros ellenálláson eső feszültséghiba korrekciójának érdekében, így a feszültséghibát minden esetben 5 mV alá csökkentettük.

A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark Biomedical Instruments, UK) üveg kapillárisokból húztuk két fázisban, majd hő alkalmazásával políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál extra- és intracelluláris oldat esetén 2-5 M $\Omega$  volt.

Külső normál oldat összetétele: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES volt (pH=7,35; 305 mOsm). A nagy koncentrációjú K<sup>+</sup> oldat összetétele: 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES volt (pH=7,35; 305 mOsm). A belső oldat összetétele D10 és HEK-tsA sejtek K<sub>v</sub>1.3 áramaira: 140 mM KF, 11 mM K<sub>2</sub>EGTA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES volt (pH=7,20; 295 mOsm). A belső oldat összetétele D10 és HEK-tsA sejtek TASK áramainak vizsgálatára: 140 mM KCl, 11 mM K<sub>2</sub>EGTA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES volt (pH=7,20; 295 mOsm). A IKCa1 mérésekhez 150 mM KCl, 5 mM HEPES, 10 mM EGTA, 8,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> összetételű belső oldatot használtuk (pH=7,20), amely 1  $\mu$ M szabad Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazott (a IKCa1 teljes aktiválása céljából).

Az extracelluláris oldat cseréjével vizsgálhatók a különböző gátlók hatásai és a csatornák farmakológiai tulajdonságai. A TEA-tartalmú külső oldat 1, 3, 10, 30 és 100 mM TEACl-ot (tetraetilammonium-klorid) valamint 145 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 1 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>-ot, 5,5 mM glükózt, 10 mM HEPES-t tartalmazott (pH=7,35; 305 mOsm). A Margatoxint normál külső oldatban oldottuk fel, amely 0,1 mg/ml marha szérum albumint (BSA, Sigma-Aldrich Ltd., Hungary) tartalmazott a toxin műanyag felületekhez (perfúziós csőhöz és Petri csészéhez) való aspecifikus kitapadásának elkerülése érdekében. Az anandamidot etanolban oldottuk fel, majd a törzsoldatot normál külső oldatban hígítottuk. Az anandamid kontroll oldatot megegyező térfogatú alkohol és normál külső oldat keverékéből készítettük el. Az oldatok cseréjét a mért sejtek környezetében gravitáció által hajtott perfúziós rendszer segítségével valósítottuk meg, folyamatos elszívás mellett.

Az áramgörbéket 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztük. A mintavételezés frekvenciája a szűrők sarokfrekvenciájának legalább kétszerese volt.



12. ábra. A teljes-sejt konfiguráció sematikus rajza

#### 4.9 Az adatok kiértékelése

Az adatok gyűjtésére és kiértékelésére a pClamp9 szoftver-csomagot (Molecular Devices Inc. Sunnyvale, CA) használtuk. A mért teljes-sejt áramgörbéket a kiértékelés elején korrigáltuk az ohmikus szivárgási áramra, és digitálisan megsűrőztük azokat (három pontos boxcar módszerrel). A mért pontokhoz az egyes függvények illesztését a Marquardt-Levenberg algoritmus segítségével végeztük.

A csatornák számát a membránban a teljes sejt konduktancia (áramamplitúdó/(aktuális feszültség + megfordítási potenciál)) és az egyedi csatorna vezetőképességnek hányadosaként határoztuk meg. Az áramsűrűségeket az áramamplitúdó és kapacitás

hányadosaként határoztuk meg (pA/pF), majd az adott csoportra vonatkozóan átlagoltuk a számolt értékeket.

A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását kétmintás t-próbával (szignifikancia-szint=0,05) vagy „Mann-Whitney Rank Sum” teszttel (MWRST) végeztük el. A mérési adatoknál az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtuk meg legalább n=4 esetén.

## 5 EREDMÉNYEK

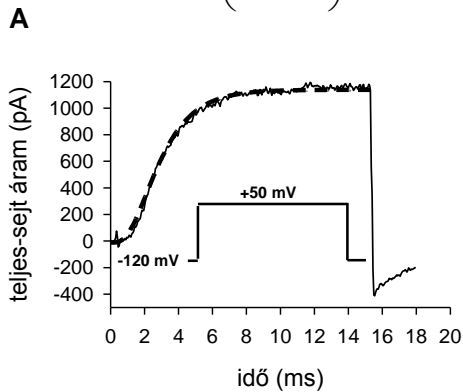
### 5.1 A Kv1.3 csatorna az immunológiai szinapsisban

#### 5.1.1 A D10 sejt vonal teljes sejt áramának biofizikai és farmakológiai jellemzése

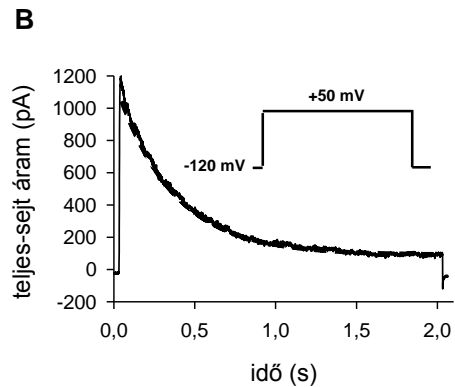
Elektrofiziológiai kísérleteink során a D10 sejt vonalon regisztrált kálium ionáramok biofizikai paramétereinek meghatározásakor az aktivációs és inaktivációs kinetikát, valamint az egyensúlyi aktiváció membránpotenciál-függését tanulmányoztuk. Az aktivációs kinetika meghatározásakor rövid, 15 ms-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az áramgörbéket Hodgkin és Huxley által kidolgozott modell szerint (HH) illesztettük az  $I(t) = I_a \times (1 - \exp(-t/\tau_a))^4 + C$  egyenlettel, ahol  $I_a$  az aktiválódó áram amplitúdója;  $\tau_a$  az aktivációs időállandó,  $C$  pedig az áram értéke a depolarizáló impulzus kezdetén (-120 mV-nál) (13A ábra). Az aktivációs időállandót egy sejt esetén 3, 15 s-onként bekövetkező depolarizáló impulzus során kialakuló aktivációs időállandó átlagából határoztuk meg ( $\tau_a = 1,36 \pm 0,06$  ms,  $n = 18$ ).

Az inaktivációs kinetika meghatározásakor hosszú, 1,5 vagy 2 s hosszúságú 40 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az inaktivációt jellemző időállandót az áramgörbe leszálló ágának egy-exponenciális függvénnyel való illesztésével határoztuk meg:  $I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_{in}) + C$ , ahol  $I_0$  az áramamplitúdó,  $\tau_{in}$  az inaktivációs időállandó,  $C$  pedig a megmaradó teljes-sejt áramérték (steady-state érték) a depolarizáló pulzus végén (13B ábra). Az inaktivációs időállandót, az aktivációs időállandóhoz hasonlóan, 3, 60 s-onként bekövetkező depolarizáló impulzus során kialakuló inaktivációs időállandó átlaga alapján határoztuk meg ( $\tau_{in} = 365 \pm 27$  ms,  $n = 17$ ).

$$I(t) = I_a \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau_a}} \right)^4 + C$$

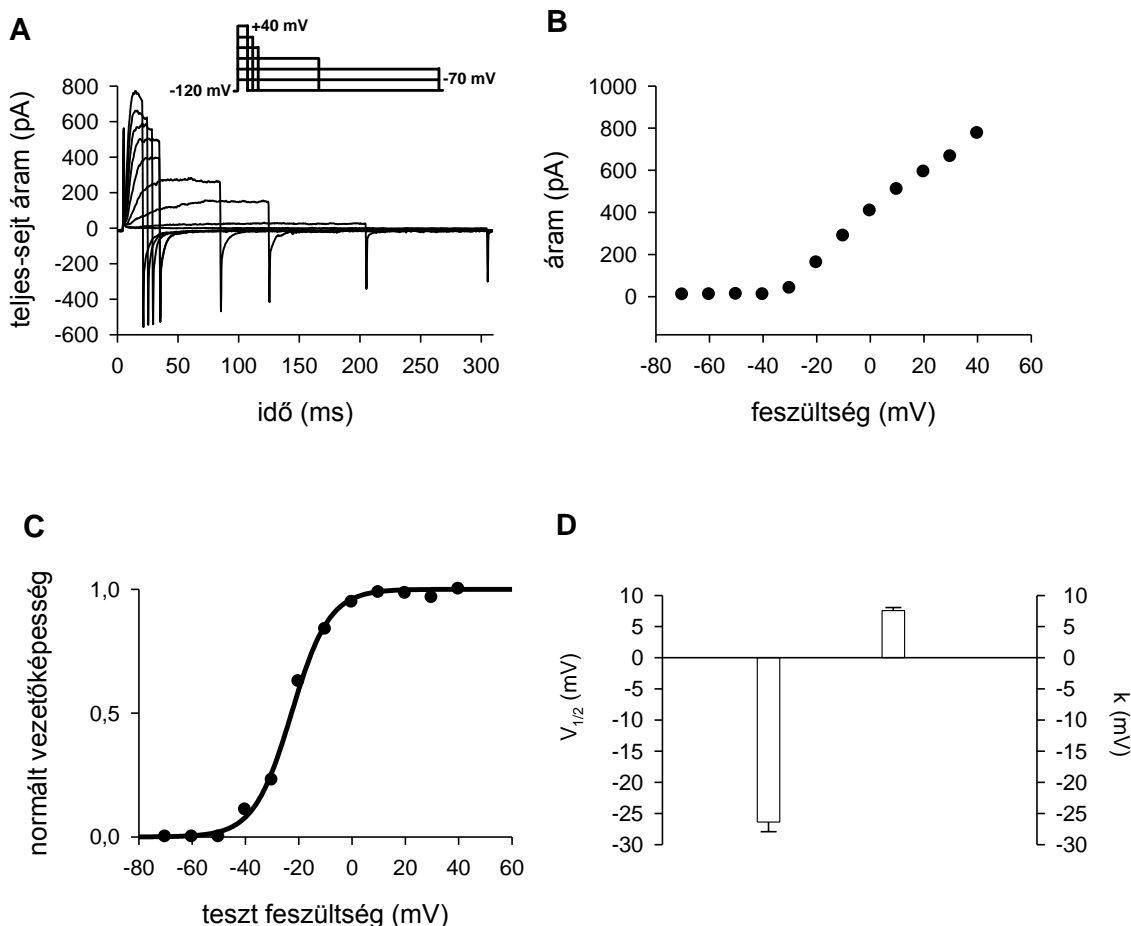


$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_i}} + C$$



**13. ábra.** D10 sejtek teljes-sejt  $K^+$  áramának biofizikai karakterizálása. **(A)** Az aktivációs kinetika meghatározása céljából a D10 sejteket  $-120$  mV tartó feszültségről  $15$  ms-ig  $+50$  mV-ra depolarizáltuk amely során ún. P/5 on-line leak korrekciót is alkalmaztunk. Az **(A)** ábrán látható áramgörbét a Hodgkin és Huxley által kidolgozott modell alapján illesztettük. Az illesztés során kapott görbét szaggatott vonallal szemléltettem. Az aktivációs időállandó értéke  $\tau_{a,c} = 1,52$  ms. **(B)** A  $K^+$  áramok inaktivációjának vizsgálata során a T sejteket  $-120$  mV-on tartva  $2$  s hosszú,  $+40$  mV-os depolarizáló impulzust adtunk a sejtekre minden  $60$ . másodpercben. A **(B)** ábrán bemutatott áramgörbe leszálló ágát egy-exponenciális függvénnyel illesztettük, az áramgörbékre illeszkedő pontokat szaggatott vonallal tüntettem fel. Az inaktivációs időállandó értéke  $\tau_{in,c} = 349,6$  ms.

Továbbá, meghatároztuk a normált konduktancia tesztpotenciál függését is. Az adatpontokhoz Boltzmann-függvényt illesztettünk, az illesztés eredményeképpen kapott félaktivációs-feszültség ( $V_{1/2} = -26,4 \pm 1,5$  mV) és a meredekség értékeket ( $k = 7,6 \pm 0,5$  mV,  $n = 12$ ) használtuk egyensúlyi aktiváció membránpotenciál függésének jellemzésére (14. ábra). Az aktiváció és inaktiváció kinetikus és steady-state paramétereinek irodalmi adatokkal történő összevetése a Kv1.3 csatornák jelenlétére utalt.

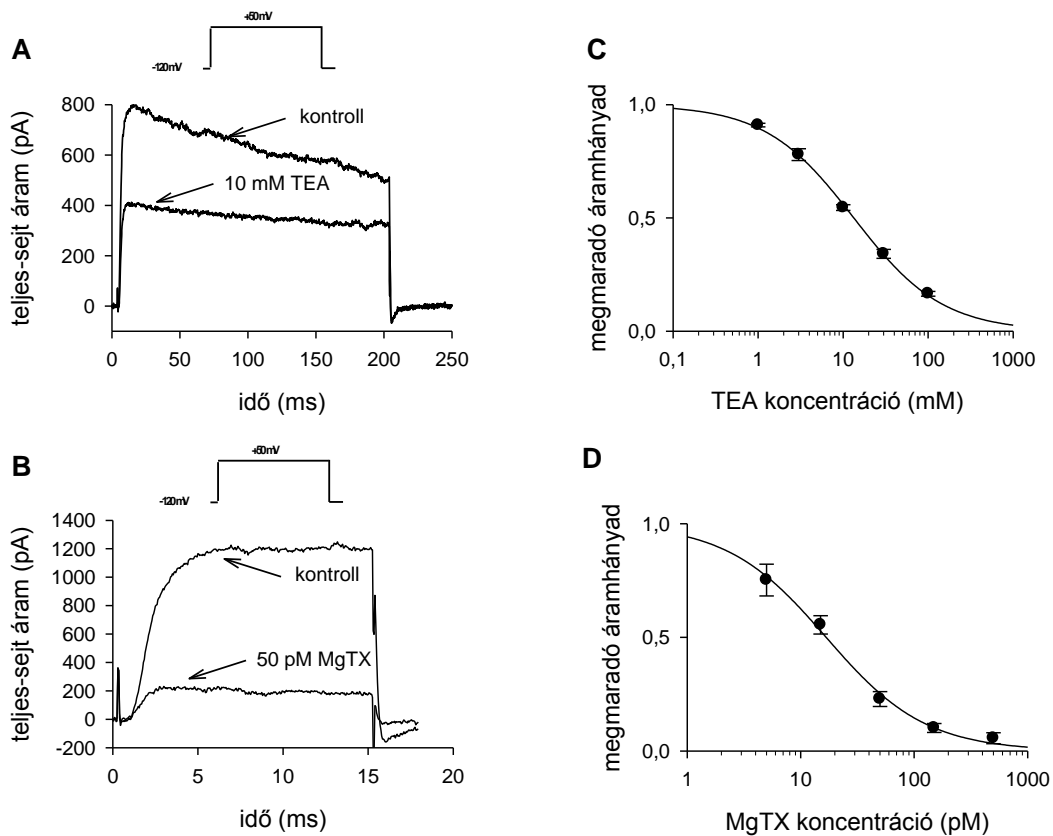


**14. ábra.** (A) A  $K^+$  áram egyensúlyi aktivációja feszültségfüggésének tanulmányozása során a sejteket  $-120$  mV-ról kiindulva  $10$  mV-os lépésekben  $-70$  mV-tól  $+40$  mV-os feszültségre depolarizáltuk minden  $30$  másodpercben. (B) Az áram – feszültség görbe segítségével meghatároztuk a megfordulási membránpotenciál értékeket. A teljes-sejt konduktanciát a  $G(V)$ ,  $G = I_{\max} / (V - E_{\text{rev}})$  egyenlettel definiáltuk, ahol  $I_{\max}$  a  $V$  tesztfeszültségnél mért áram csúcsértéke,  $E_{\text{rev}}$  pedig az áram megfordulási potenciálja. (C) A  $G(V)$  értékeket a maximális értékre normálva ( $G_N$ ) a tesztfeszültség függvényében ábrázoltuk, majd Boltzmann függvénnyel illesztettük ( $G_N(V) = 1 / (1 + \exp [-(V - V_{1/2}) / k_c])$ , ahol  $V$  a tesztfeszültség,  $V_{1/2}$  a függvény középpontja, a félaktivációs feszültség,  $k$  a meredeksége). (D) A félaktivációs feszültség és meredekség értéke  $V_{1/2} = -22,7$  mV és  $k = 7,1$  mV.

Viszont a kálium csatornák kizárólag biofizikai jellemzők alapján történő azonosítása nem egyértelmű; néhány rágszáló T limfocita sejtvonal Kv3.1 csatornákat is kifejezhet, ami szintén hozzájárulhat a D10 sejtvonal teljes-sejt áramához. Ezért a  $K^+$  csatornák általános, és a Kv1.3 csatornák specifikus gátlószerével, a tetraetilammonium (TEA) és a MgTX alkalmazásával farmakológiai karakterizálást végeztünk.

$10$  mM TEA jelenlétében a gátlás mellett C-típusú inaktivációt is megfigyeltünk (15A ábra).  $50$  pM MgTX a kontroll körülmények között mért teljes-sejt ionáram csúcsértékét

megközelítőleg 22 %-ára csökkentette (15B ábra). Ezen két gátlószer dózis-hatás görbéje a 15C és 15D ábrákon látható. A dózis-hatás görbékre két-paraméteres Hill egyenletet illesztettünk, amely alapján meghatároztuk a  $K_d$  értékeket: 13,4 mM értéket kaptunk a TEA-ra, míg 16,8 pM értéket a peptid toxinra. Ezek alapján egyértelműen eldönthető volt, hogy a D10 sejtek endogén Kv1.3 kálium csatornákat expresszálnak.

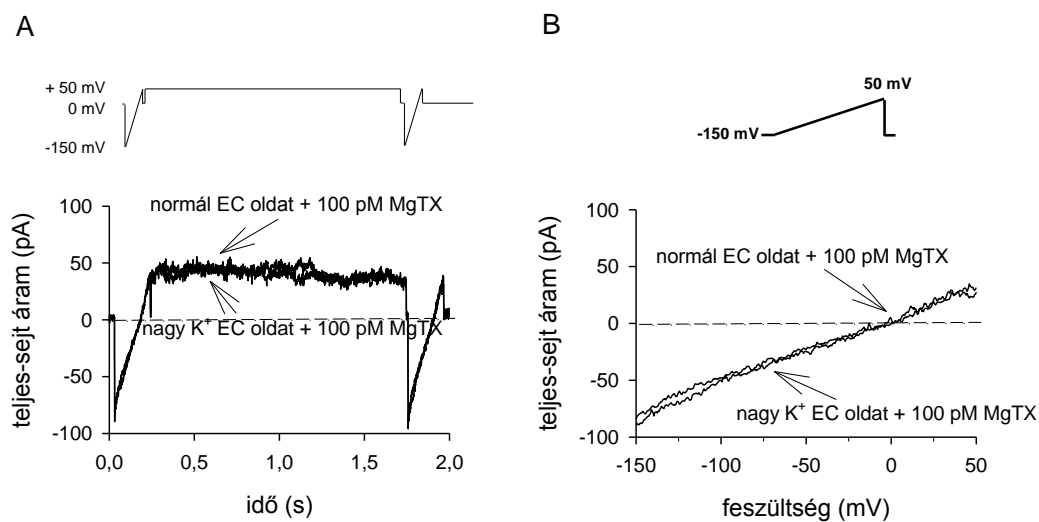


**15. ábra.** D10 sejtek  $K^+$ -áramainak farmakológiai vizsgálata. Az **(A)** ábrán látható áram görbéket 200 ms hosszú + 50 mV-os depolarizáló impulzusok alkalmazása során regisztráltuk kontroll körülmények között és 10 mM TEA oldat jelenlétében (-120 mV tartófeszültség mellett). A **(B)** ábrán bemutatott  $K^+$ -áram görbe 50 pM Margatoxin (MgTX) D10 sejtre kifejtett gátló hatását szemlélteti, mely görbéket 15 másodpercenként bekövetkező, 15 ms hosszú +50 mV-os depolarizáló impulzusok alkalmazásával regisztráltunk (-120 mV tartófeszültség mellett). **(C)** A megmaradó áramhányadokat a TEA-koncentráció függvényében ábrázoltuk. Minden adatpontot 3-4 egymástól független kísérlet alapján határoztunk meg (SEM). A megmaradó áramhányadokat a gátlószer jelenlétében és hiányában kapott csúcsáramok hányadosaként állapítottuk meg. Az ábrázolt görbe az adatpontokra illeszkedő Hill egyenletet szemlélteti  $K_d = 14,3$  mM értékkel ( $n_H = 0,83$ ). **(D)** Változó koncentrációban alkalmazott MgTX dózis-hatás görbét mutatjuk be, ahol minden mérési pont szintén 3-4 egymástól független mérés eredménye. Hill egyenlettel illesztett adatsor alapján a  $K_d = 16,8$  pM ( $n_H = 0,99$ ).

### 5.1.2 A TASK csatornák feltételes jelenlétének vizsgálata a D10 sejtvonalon

A „*Functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse*” című közleményünkre érkezett kritikai megjegyzéseket tárgyaló cikkben a szerzők azt fejtették ki, hogy a D10 sejtvonal teljes-sejt áramához a Kv1.3 csatornák mellett a kétpórusú TASK-1 és TASK-3 csatornák is hozzájárulnak. Annak érdekében, hogy kizárjuk az említett kétpórusú K<sup>+</sup> csatornák jelenlétét, kísérleteinket a D10 sejtekben feltételesen expresszálandó TASK-1 és TASK-3 csatornák vizsgálatára irányítottuk.

A karakterizálás során, mivel a TASK csatornák idő- és feszültségfüggetlenek (hasonlóan az IKCa1 csatornákhöz), feszültség-rámpa protokoll segítségével megmértük a teljes-sejt áramokat D10 sejtekben. KCl-alapú, Ca<sup>2+</sup>-mentes belső oldatot alkalmaztunk, hogy az IKCa1 csatornák hozzájárulását elhanyagolhatóvá tegyük a vizsgált limfocitákban. A feszültségfüggő Kv1.3 csatornák eliminálására 100 pM Margatoxint alkalmaztunk, valamint a tartófeszültséget 0 mV-ra állítottuk (a Kv1.3 csatornák ennél a feszültségnél inaktíválódnak) az ún. dupla-rámpa protokoll alkalmazása mellett (16A ábra). A megfordítási potenciált -4mV-nak határoztuk meg (16B ábra), amely sokkal pozitívabb, mint ami a TASK csatornák jelenlétében várható lett volna (elméleti érték az oldatok összetételének ismeretében -85 mV). Ezen túl, 150 mM K<sup>+</sup>-tartalmú oldat jelenlétében nem tapasztaltunk jelentős jobb oldali eltolódást az áram és feszültség függvényében, a TASK csatornák jelenléte a D10 sejtvonalon ez alapján kizárható.

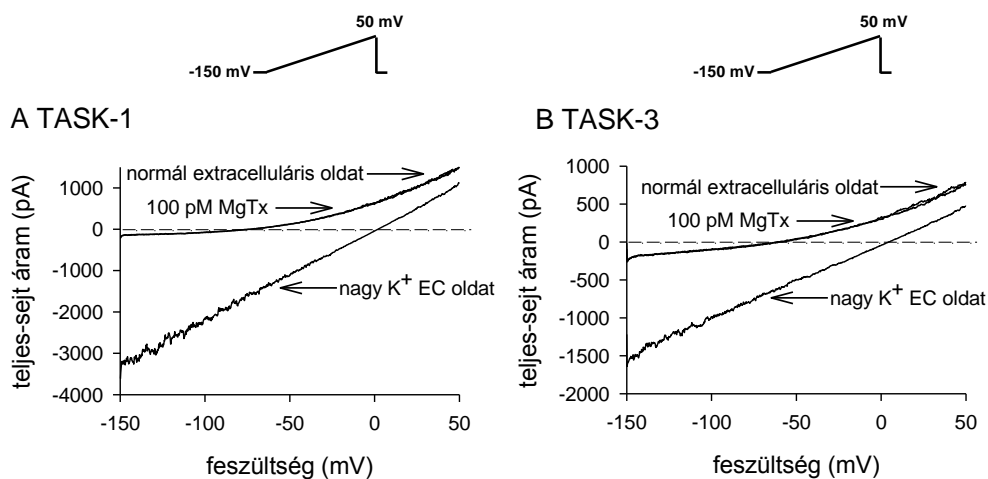


**16. ábra.** (A, B) TASK csatornák karakterizálása D10 sejtekben. (A) A D10 sejteken minden 15. másodpercben dupla-rámpa protokollt alkalmaztunk 0 mV tartófeszültségről indulva a Kv1.3 áramok kizárása céljából: a két 200 mV-os feszültség-rámpát egy 1,5 másodperc hosszú, +50 mV-os depolarizáló lépés választja el. (B) I-V kapcsolat; a teljes-sejt áramokat normál extracelluláris oldat, és 150 mM K<sup>+</sup> oldat jelenlétében 0 mV

tartófeszültségről indulva feszültség-rámpa protokoll segítségével -150 mV és +50 mV közötti feszültségtartományban regisztráltuk. Mindkét oldat 100 pM MgTX-t tartalmazott.

### 5.1.3 A kétpórusú $K^+$ csatornák nem érzékenyek Margatoxinra

Ahhoz, hogy a kétpórusú csatornák jelenlétét tovább vizsgáljuk expressziós rendszerre tértünk át, ahol nagyobb az áram. HEK-tsA sejtekbe mTASK-1 (egér) és hTASK-3 (humán) csatornákat kódoló plazmid DNS-eket transzfektáltunk, majd megvizsgáltuk 100 pM MgTX hatását ezekre a csatornákra. Korábban kimutattuk, hogy a Margatoxin, mely széles körben elfogadott Kv1.3 csatornaspecifikus gátlószer, ebben a koncentrációban a Kv1.3 csatornák több mint 85%-át gátolja. Ugyanez a koncentráció hatástalannak bizonyult a HEK-tsA sejtekben kifejezett TASK-1 és TASK-3 csatornák esetében (17A és B ábra). Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a D10 sejtvonaltól teljes-sejt  $K^+$  áramait Kv1.3 csatornák adják, és a TASK-1 és TASK-3 csatornák a teljes-sejt áramhoz való hozzájárulása elhanyagolható.

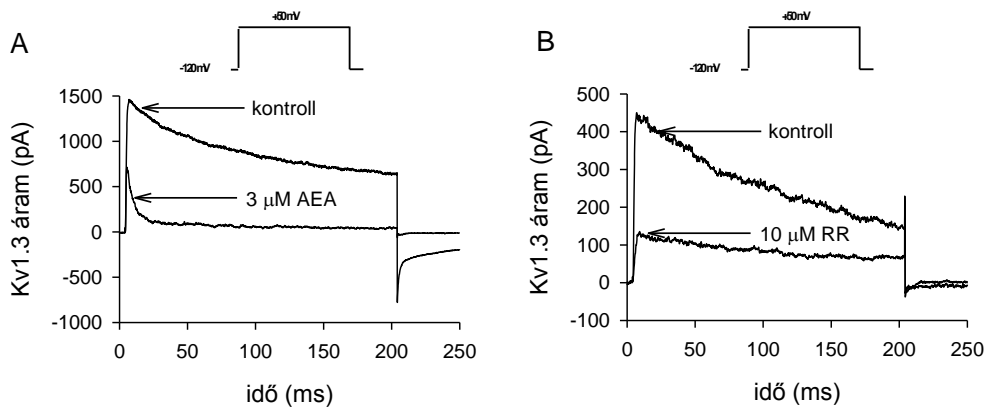


**17. ábra.** (A, B) Margatoxin hatása TASK-1 és TASK-3 csatornákra. -150 és + 50 mV-os feszültségtartományban 15 másodpercenként bekövetkező, 500 ms hosszú feszültségrámpát alkalmaztunk HEK-tsA 201 sejtek mTASK-1 (A) és hTASK-3 (B) áramaira 0 mV tartófeszültség mellett.

### 5.1.4 TASK gátlószer hatása a Kv1.3 csatornára

Megvizsgáltuk az anandamid (AEA) és ruténium vörös (RR) HEK-tsA sejtekbe transzfektált Kv1.3 csatornákra kifejtett gátló hatását. Az anandamid elfogadott Kv1.2, Kv1.5 és Kv4.3 gátlószer, a ruténium vörösről eddig nem közöltek adatot a Kv1.3 csatornák gátlásával kapcsolatban. Az anandamidot 3 és 30  $\mu$ M koncentrációban, a ruténium vöröset 10  $\mu$ M koncentrációban alkalmaztuk (18A és B ábra). Mindkét anyagot a Kv1.3 csatornák

hatékony gátlószereinek találtak, a Kv1.3 csatornák áramamplitúdóit szignifikánsan csökkentették, és a Kv1.3 esetében megbecsült  $K_d$  értékek jó egyezést mutattak a kétpórusú csatornákra leírtakkal (AEA:  $3\mu\text{M}$ , RR:  $4\mu\text{M}$ ). Továbbá, anandamid alkalmazása során az inaktivációs kinetika gyorsulását tapasztaltuk. Azért, hogy minimálisra csökkentsük az endogén Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramhoz való hozzájárulását, a csatornákat túlexpresszáztuk a HEK-tsA sejtekben, és outside-out konfigurációt alkalmaztunk az áramok regisztrálása során. Ezek az eredmények azt szemléltetik, hogy mind az anandamid, mind a ruténium vörös, a TASK csatornáknál alkalmazott koncentrációkkal összevethetően, a Kv1.3 csatornák gátlószerei is, ezért a két csatornatípus ezeknek a vegyületeknek az alkalmazásával nem különíthető el. Úgy gondoljuk, hogy az anandamid alkalmazása mellett regisztrált inaktivációs kinetikában bekövetkező változások az anandamid Kv1.3 csatornákra kifejtett hatásának, mintsem a TASK csatornák szelektív kiiktatásának következménye.



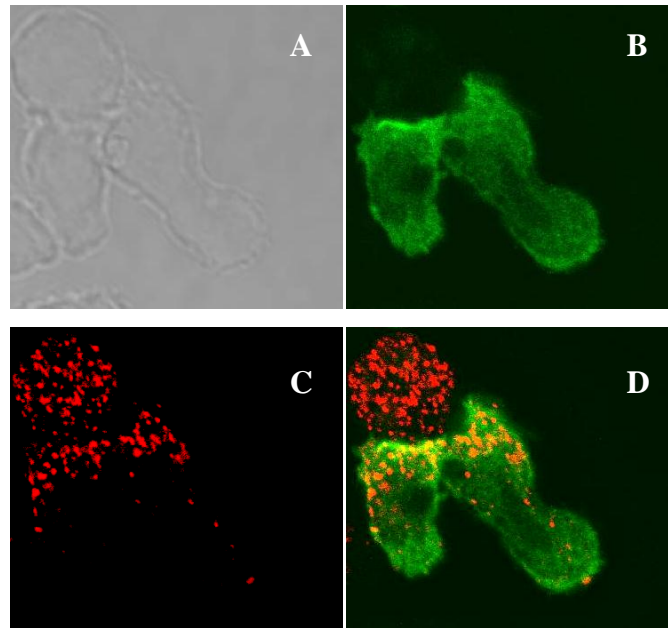
**18. ábra. (A, B)** Anandamid (AEA) és ruténium vörös (RR) hatása HEK tsA sejtekben kifejezett Kv1.3 csatornákra. Az áramgörbét 200 ms hosszú, 15 másodpercenként bekövetkező +50 mV-os depolarizáló impulzusokkal, -100 mV tartófeszültség alkalmazása mellett, outside-out konfigurációban regisztráltuk normál extracelluláris oldat és (A)  $3\mu\text{M}$  anandamid valamint (B)  $10\mu\text{M}$  ruténium vörös jelenlétében.

Továbbá belátható, hogy egy exponenciális csökkenés vagy növekedés időbeli lefolyása konstans értéktől független. Az egyenlet alapján, ami az áram inaktivációs kinetikáját írja le,  $I(t) = I_0 \times e^{-t/\tau} + C$ , ahol  $I(t)$  az időfüggő áram,  $I_0$  az inaktiválódó áramkomponens amplitúdója,  $\tau$  az inaktivációs időállandó, belátható hogy az időfüggetlen TASK áram hozzáadásával a teljes-sejt áram csak a függőleges tengely mentén tolódik el. A TASK áram feszültség- és időfüggetlen, tehát egy konstans érték növelésével az exponenciális lefutás nem befolyásolható.

Ezek alapján megállapítottuk, hogy a D10 sejtek nem, vagy csak nagyon kis mértékben fejeznek ki TASK csatornákat a membránjukban.

### 5.1.5 A Kv1.3 csatornák kapuzása megváltozik az immunológiai szinapszisban

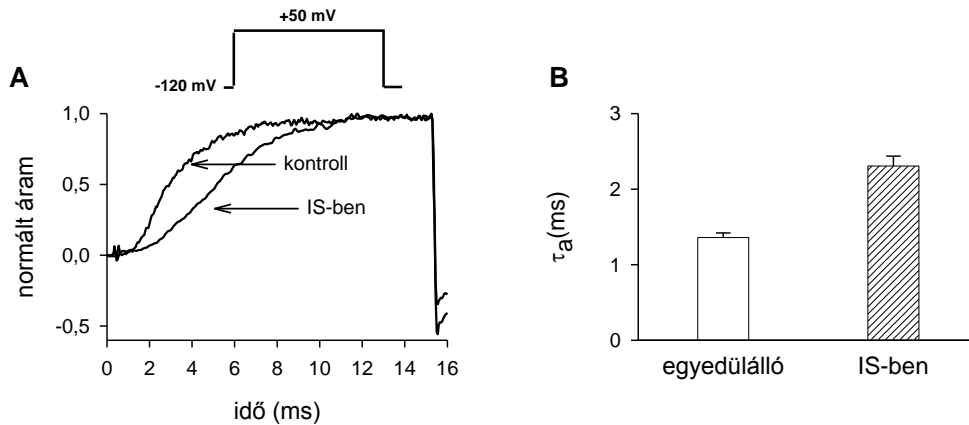
Az immunológiai szinapszis kialakulását számos membrán- és citoszolikus fehérje átrendeződése kíséri. Korábban [23] valamint a D10-CH12-LX sejt pár alkotta szinapszisban is kimutattuk, hogy a Kv1.3 csatornák a két sejt közötti kontaktrégiójába rendeződnek (19. ábra).



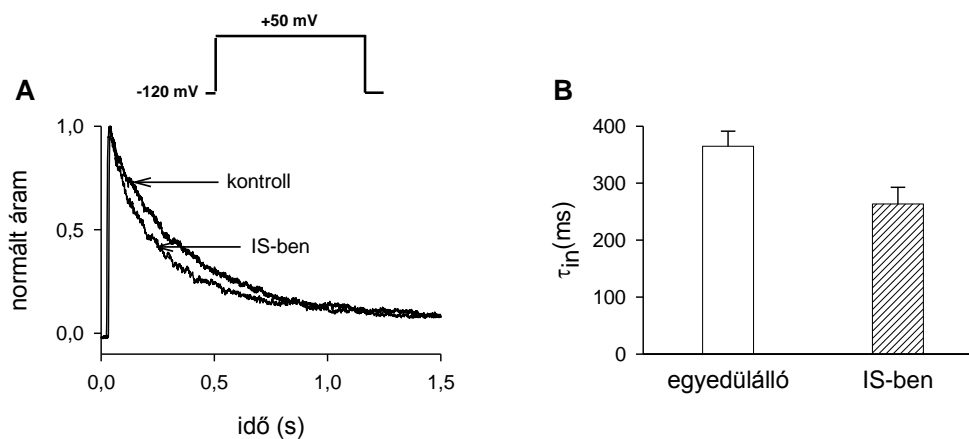
**19. ábra.** Kv1.3 csatornák átrendeződése az immunológiai szinapszisba. (A) Transzmissziós kép, (B) GFP-vel konjugált PKC- $\theta$  enzim fluoreszcens jele (zöld, gerjesztés 488 nm-en, Ar-lézer), (C) Kv1.3 csatornák jele (piros, gerjesztés 543 nm-en, He-Ne lézer), (D) a 488 nm-es és 543 nm-es csatornák átfedő jele (B + C). A konfokális mikroszkóppal készített szeletek vastagságát 1  $\mu\text{m}$ -re állítottuk be. A felvételen két D10 sejt középső és egy CH12-LX sejt felső szelete látható. A T sejt – B sejt konjugátumokat előzőleg poly-L-lysine-es fedőlemezre tapasztottuk ki, a sejtek keverését és centrifugálását követően 10 perc múlva fixáltuk 4% paraformaldehid oldattal, majd Kv1.3 ellenes antitesttel jelöltük indirekt módon.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, milyen következményekkel jár ez a folyamat, azaz a csatornafunkció más fehérjék általi módosítása milyen mértékben valószínűsíthető, az APC-hez kapcsolódó D10 sejteknek is megvizsgáltuk a teljes-sejt áramait. Az APC-hez kapcsolódó és egyedülálló D10 sejten kifejeződő Kv1.3 csatornák normált áramgörbéit összehasonlítva mind az aktivációs kinetikában ( $\tau_{a,c} = 1,36 \pm 0,06$  ms,  $\tau_{a,IS} = 2,36 \pm 0,13$  (n = 7),  $p < 0,001$ ), mind az inaktivációs kinetikában ( $\tau_{in,c} = 365 \pm 27$  ms,  $\tau_{in,IS} = 263 \pm 29$  (n = 7),  $p = 0,037$ ) bekövetkezett különbségeket szignifikánsnak találtuk, vagyis az IS-ban lévő D10 sejtekben a

Kv1.3 csatornák aktivációja jelentősen lelassult (20A, B ábrák), az inaktivációs kinetika pedig jelentős mértékű gyorsulást mutatott és (21A, B ábrák). Az immunológiai szinapszisban résztvevő T sejtek kinetikus és egyensúlyi paramétereit a D10 sejtek karakterizálásával megegyező módon vizsgáltuk, (13-14. ábrák) és hasonlítottuk össze.

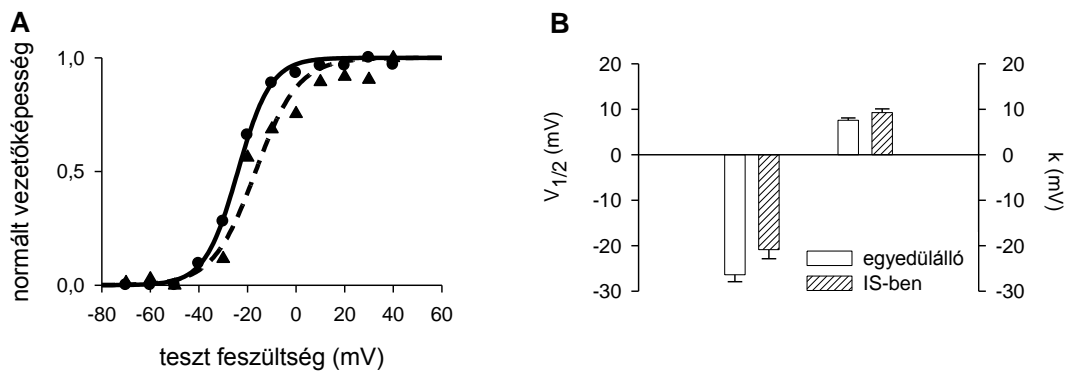


**20. ábra.** Kv1.3 csatornák kapuzása az immunológiai szinapszisban I. Az aktivációs kinetika tanulmányozása során 15 ms-os +40 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az (A) ábrán egy egyedülálló és egy szinapszisban lévő D10 sejt normált  $K^+$ -áramai láthatók. Az aktivációs áramgörbét a Hodgkin-Huxley  $n^4$ -es modellel illesztettük. Az ábrán látható áramgörbékhez tartozó aktivációs időállandó értékek a következők:  $\tau_{a,c} = 1,56$  ms és  $\tau_{a,IS} = 2,28$  ms. (B) Az egyedülálló és szinapszisban lévő T sejtek aktivációs időállandóiban bekövetkező különbségeket a paraméterek átlagaiként, oszlopdiagramokon szemléltetem a szórásokat is feltüntetve.



**21. ábra.** Kv1.3 csatornák kapuzása az immunológiai szinapszisban II. Az inaktivációs kinetika tanulmányozása során 1,5 ms-os +50 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az (A) ábra jól szemlélteti a szinapszisban lévő sejt inaktivációs kinetikájának felgyorsulását. A bemutatott áramgörbe leszálló ágát egy-exponenciális függvénnyel illesztettük. Az inaktivációs időállandók a következők:  $\tau_{in,c} = 350$  ms és  $\tau_{in,IS} = 251$  ms. (B) Az egyedülálló és szinapszisban lévő T sejtek inaktivációs időállandóiban bekövetkező különbségeket a paraméterek átlagaiként, oszlopdiagramokon szemléltetem a szórásokat is feltüntetve.

Feltételeztük, hogy a kinetikában bekövetkező változások az aktiváció egyensúlyi paramétereit is módosíthatják. A tesztfeszültség függvényében ábrázolt normált vezetőképességek alapján azt találtuk, hogy szinapszisban lévő Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának membránpotenciál függése a pozitív feszültségek irányába tolódott el ( $V_{1/2,c} = -26,4 \pm 1,5$  mV (n = 12),  $V_{1/2,IS} = -20,9 \pm 2$  mV (n = 7),  $p < 0,05$ ). Az IS-ban lévő Kv1.3 csatornák meredekség értéke is nagyobb volt, bár a különbség statisztikailag nem szignifikáns ( $k_c = 7,6 \pm 0,5$  mV,  $k_{IS} = 9,3 \pm 0,8$  mV,  $p = 0,115$ ) (22A és B ábra).



**22. ábra.** Kv1.3 csatornák kapuzása az immunológiai szinapszisban III. A membránpotenciál feszültségfüggésének tanulmányozása céljából -70 mV és +40 mV közötti depolarizáló impulzusokat használtunk. **(A)** A normált vezetőképesség feszültségfüggését kontroll (●) és szinapszisban lévő T sejt (▲) esetén Boltzmann-függvénnyel ábrázoltuk. A meredekség és félaktivációs feszültségértékek az ábrán bemutatott sejtre vonatkozóan:  $k_c = 6,8$  mV,  $V_{1/2,c} = -24$  mV;  $k_{IS} = 8,8$  mV,  $V_{1/2,IS} = -16,6$  mV. **(B)** Az egyedülálló és szinapszisban lévő T sejtek egyensúlyi paramétereiben (meredekség és félaktivációs feszültség) bekövetkező különbségeket a paraméterek átlagáiként, oszlopdiagramokon szemléltetem a szórásokat is feltüntetve.

Az inaktivációs kinetikai paraméterek változása alapján arra következtettünk, hogy valamilyen foszforilációs vagy defoszforilációs folyamat áll a jelenség hátterében.

Az APC-hez kapcsolódó és egyedülálló T sejtek Kv1.3 áramsűrűségét is megvizsgáltuk (+40 mV-nál áramamplitúdó / sejt kapacitása) ( $CD_c = 154 \pm 16$  pA/pF,  $CD_{IS} = 104 \pm 19$  pA/pF), ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak.

### 5.1.6 PK antagonisták gyorsítják a Kv1.3 inaktivációját

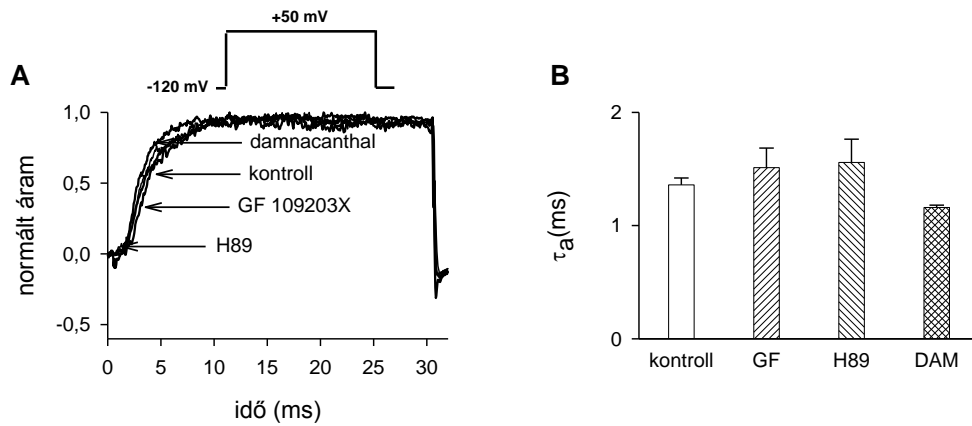
Mivel nem ismert, hogy a D10 sejtekben a Kv1.3 csatornához mely protein kináz/foszfátáz képes asszociálni, ezért megvizsgáltunk két PK és egy  $p56^{lck}$  inhibitor Kv1.3 csatornák áramaira gyakorolt hatását, amelyek a következők voltak: a PKA-t gátló H89 ( $K_d \approx$

50 nM), a PKC inhibitor GF109203X (GF,  $K_d \approx 14$  nM) valamint a p56<sup>lck</sup> kináz gátló Damnachantal (DAM,  $K_d \approx 17$  és 620 nM). Ezeknek a vegyületeknek közvetlen gátló hatása is van ionszatornákra, pl. a H89 Kv1.3 csatorna gátlószer ( $IC_{50} = 1,7$   $\mu$ M), a GF Kv1.5 gátlószer ( $K_d = 1-2$   $\mu$ M), ezért a kísérletekben alkalmazott koncentrációkat úgy állítottuk be, hogy elkerüljük ezen vegyületek blokkoló hatását, ugyanakkor még effektíven inaktíválják a protein kinázokat. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: H89: 0,1  $\mu$ M, GF: 0,5  $\mu$ M, DAM: 1  $\mu$ M.

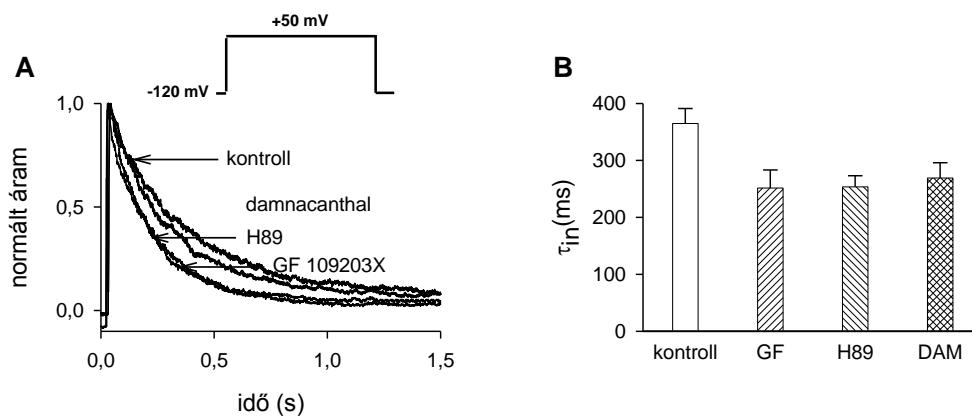
30 ms hosszú, +50 mV-os depolarizáló impulzusokkal vizsgáltuk a csatornák aktivációs kinetikáját kontroll és PK antagonistákkal kezelt sejteken, amelyet szintén az n<sup>4</sup>-es HH modellel illesztettünk meg. Az aktivációs kinetika a PK antagonisták hatására nem változott szignifikánsan ( $\tau_{a,c} = 1,36 \pm 0,06$  ms, (n = 18)  $\tau_{a,GF} = 1,51 \pm 0,17$  ms (n = 9), p = 0,3;  $\tau_{a,H89} = 1,56 \pm 0,2$  ms (n = 13) p = 0,3;  $\tau_{a,DAM} = 1,16 \pm 0,19$  ms (n = 6) p = 0,22) (23 A és B ábra).

Az inaktivációs kinetika vizsgálata során azonban mind a H89, mind a GF109203X vegyületekkel, mind pedig a Damnachantallal történő kezelés során azt tapasztaltuk, hogy a Kv1.3 csatornák inaktivációja gyorsul, az inaktivációs időállandó szignifikánsan csökkent a kezeletlen kontrollokhoz képest a D10 sejtekben ( $\tau_{in,c} = 365 \pm 27$  ms, (n = 17)  $\tau_{in,GF} = 252 \pm 32$  ms (n = 9);  $\tau_{in,H89} = 254 \pm 20$  ms (n = 12);  $\tau_{in,DAM} = 269 \pm 27$  ms (n = 7) p < 0,05) (24A és B ábra).

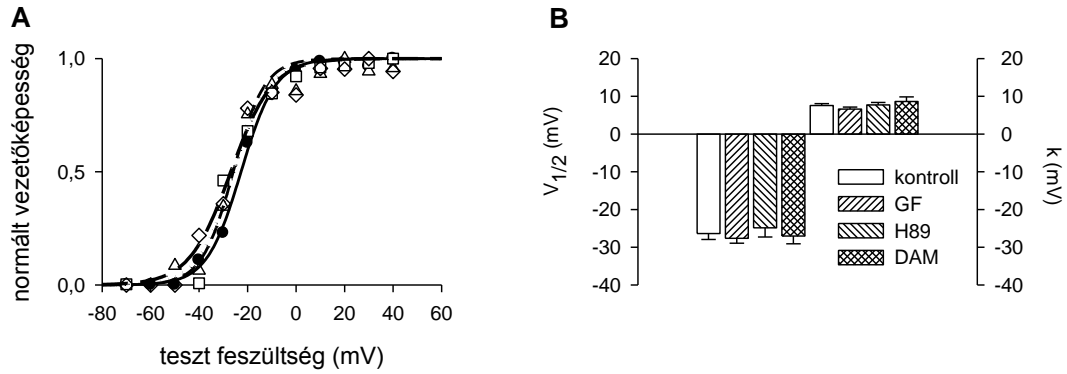
Az aktiváció egyensúlyi és kinetikai jellemzőit is tanulmányoztuk; az egyensúlyi aktiváció paraméterei, feszültségfüggése és meredeksége nem változtak meg szignifikánsan a PK inhibitorokkal történő kezelés hatására ( $(V_{1/2,c} = -26,4 \pm 1,5$  mV (n = 12);  $(V_{1/2,GF} = -27,6 \pm 1,3$  mV (n = 7);  $(V_{1/2,H89} = -24,8 \pm 2,4$  mV (n = 10);  $(V_{1/2,DAM} = -27,0 \pm 2,1$  mV (n = 5);  $k_c = 7,6 \pm 0,5$  mV;  $k_{GF} = 6,6 \pm 0,6$  mV;  $k_{H89} = 7,7 \pm 0,6$  mV;  $k_{DAM} = 8,6 \pm 1,2$  mV, p = 0,05) (25A és B ábra).



**23. ábra.** A protein kinázok aktivációs kinetikára kifejtett hatásának tanulmányozására a 12A ábránál leírt protokollt használtuk. Az **(A)** ábrán egy kontroll sejt és három különböző kezelés mellett regisztrált sejt normált áramgörbéi láthatók. Az aktivációs kinetikát a Hodgkin-Huxley egyenlet alapján illesztettük. Az ábrán bemutatott kontroll és kezelt sejt aktivációs időállandói a következők:  $\tau_{a,c} = 1,56$  ms,  $\tau_{a,GF} = 1,43$  ms,  $\tau_{a,H89} = 1,41$  ms,  $\tau_{a,DAM} = 1,44$  ms. A **(B)** ábra oszlopdiagramokon szemlélteti az aktivációs időállandó értékek átlagait és szórásait.



**24. ábra.** A protein kináz antagonistákkal kezelt sejtekben fegyorsul a csatornák inaktivációja, amelyet a 12B ábránál ismertetett protokollal vizsgáltunk. Ezt szemlélteti az **(A)** ábra. Az inaktivációs kinetikát egy-exponenciális függvényrel illesztettük. Az inaktivációs időállandók az ábrán bemutatott áramgörbékre a következők:  $\tau_{in,c} = 350$  ms,  $\tau_{in,GF} = 203$  ms,  $\tau_{in,H89} = 190$  ms,  $\tau_{in,DAM} = 261$  ms. A **(B)** ábra oszlopdiagramokon szemlélteti az inaktivációs időállandó értékek átlagait és szórásait.



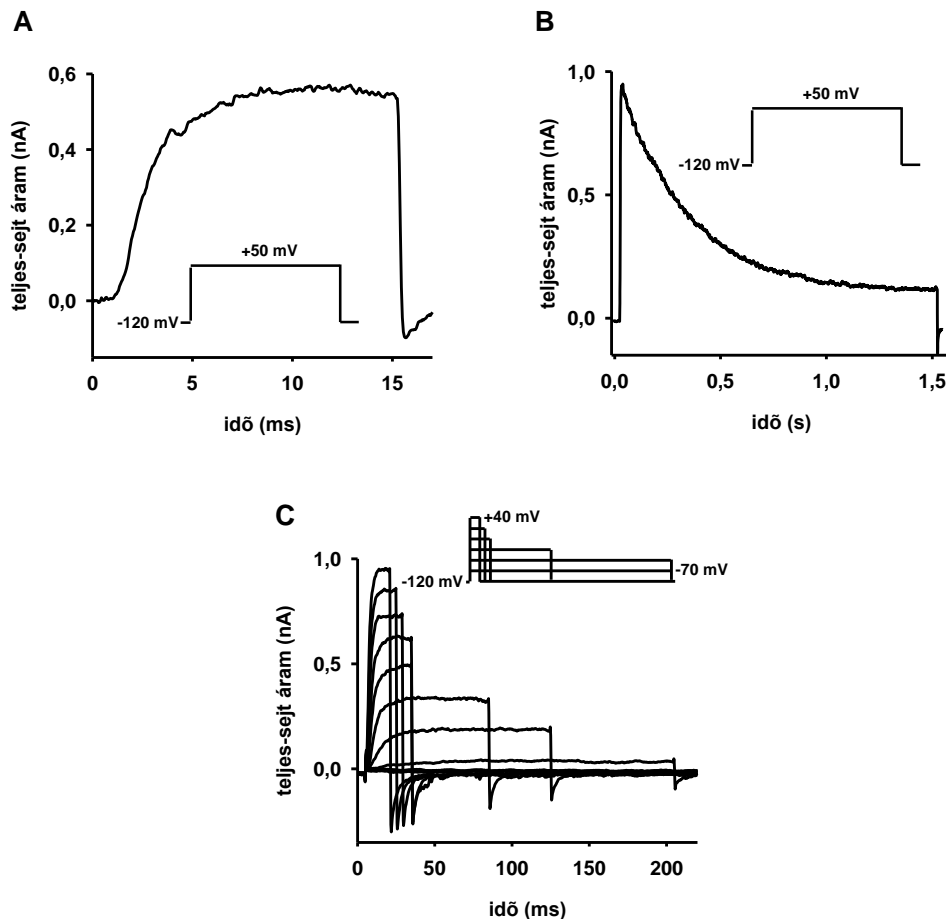
**25. ábra.** Az (A) ábrán egy kontroll (●) valamint egy GF109203X- (Δ), H89- (□) és damnacanthal- (◇) kezelt sejt normált vezetőképességének feszültségfüggése látható. A méréseket a 13. ábrán ismertetett rotokollt használtuk. Az adatokat Boltzmann-függvénnyel ábrázoltuk: kontroll (folytonos vonal), GF109203X (rövid szaggatott vonal), H89 (pontozott vonal) és Damnacanthal (hosszú szaggatott vonal). A meredekség és félaktivációs feszültségértékek az ábrán szemléltetett sejtek esetén a következők:  $k_c = 7,1$  mV,  $V_{1/2,c} = -22,7$  mV;  $k_{GF} = 6,5$  mV,  $V_{1/2,GF} = -25,9$  mV;  $k_{H89} = 7,3$  mV,  $V_{1/2,H89} = -25,8$  mV;  $k_{DAM} = 8,6$  mV,  $V_{1/2,DAM} = -26,9$  mV. A (B) ábra oszlopdiagramokon szemlélteti a meredekség és félaktivációs feszültség értékek átlagait és szórásait.

Minden kezelésre megbecsültük az áramsűrűségeket (CD) is, a H89 és Damnacanthal esetében szignifikáns csökkenés következett be ( $CD_c = 154 \pm 16$  pA/pF,  $CD_{H89} = 89,4 \pm 14$  pA/pF,  $CD_{DAM} = 85,9 \pm 20$  pA/pF,  $p < 0,05$ ), míg a GF kezelés, méréseink szerint, nem befolyásolta jelentősen a csatornaaktivitást ( $CD_{GF} = 163,1 \pm 25$  pA/pF).

## 5.2 $K^+$ csatornamintázat vizsgálata egészséges és sclerosis multiplexes donoroktól izolált $CD4^+$ regulátor és naiv T sejteken

### 5.2.1 Perifériás limfociták karakterizálása

Egészséges donorokból izolált naiv T sejteken különböző feszültség protokollokkal regisztrált teljes-sejt áramok láthatók az 25. ábra paneljein. A feszültségfüggő  $K^+$  csúcsáram mérésekhez, a D10  $T_H2$  sejtvonalhoz hasonlóan, rövid depolarizáló impulzusokat használtunk (26A ábra). Hosszabb depolarizáló impulzusok során a teljes-sejt áramok inaktiválódtak [191], amelyet az áramgörbe leszálló ágához illesztett egy-exponenciális függvény alapján meghatározott inaktivációs időállandóval jellemeztünk (26B ábra). Ismert, hogy a feszültségkapuzott csatornák esetében az egyensúlyi aktiváció (G-V görbe) feszültségfüggése jellemző az adott csatornára, így alkalmas annak azonosítására, illetve a különböző élettani körülmények során az ioncsatorna kapuzásában bekövetkező változások észlelésére. Az áram-feszültség függést  $-70$  és  $+40$  mV között,  $10$  mV-os lépésekben növekvő teszt feszültségek mellett regisztrált áramérték alapján határoztuk meg úgy, hogy minden alkalmazott teszt-feszültségre kiszámoltuk a normált vezetőképességeket, hogy vezetőképesség-feszültség függvényt (G-V görbét) kapjunk (26C ábra). A mérési pontokat Boltzmann-függvénnyel illesztettük, majd meghatároztuk a félaktivációs feszültséget ( $V_{1/2}$ ) valamint a meredekség értéket (k). Mind a naiv, mind a  $T_{reg}$  sejtek esetében az áramok biofizikai tulajdonságai az irodalomban leírt T sejtek membránjában uralkodóan kifejeződő  $Kv1.3$   $K^+$ -csatornák tulajdonságaival megegyezők [31, 41]. Méréseink egyik sejtpopuláció esetében sem utaltak más feszültség-kapuzott csatorna jelenlétére. Korábbi adatokkal összhangban sejtenként néhány száz csatorna járult hozzá a mért csúcsáramokhoz [31, 41].



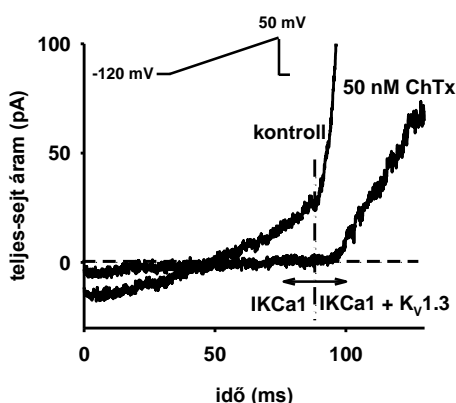
**26. ábra.** T sejteken regisztrált teljes-sejt káliumion áramok. A T sejteken jelen lévő ioncsatornák megismerésére különböző feszültség-protokollokat alkalmaztunk. A sejtmembránt 15 ms hosszúságú +50 mV-os impulzusokkal depolarizáltuk -120 mV tartófeszültségről 10 kHz-es mintavételezési frekvencia mellett. Az így alkalmazott protokoll az aktivációs kinetika tanulmányozását tette lehetővé (A). A mintavételi gyakoriságot 2 kHz-re állítottuk a Kv1.3 áramok inaktivációs kinetikájának vizsgálata során. Ezalatt ugyanilyen tartófeszültség mellett 1500 ms-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk (B). Az áram-feszültség (I-V) kapcsolatot 10 mV-os lépésenként -70 mV és +40 mV között ismétlődő depolarizáló impulzusokat tartalmazó protokoll segítségével mértünk meg, szintén -120 mV-on tartva a membránpotenciált. A növekvő feszültségértékekkel az áramok aktivációja gyorsult, így a depolarizáló impulzusok időtartamát csökkentettük, hogy elkerüljük a csatornák inaktivációját (C).

A Kv1.3 csatornák mellett a T sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált IKCa1 csatornákat is kifejeznek aktivációs állapotuktól és altípusuktól függően [184]. Mivel ezek a csatornák csak emelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció mellett aktiválódnak, így a belső oldat  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmát 1  $\mu\text{M}$ -ra állítottuk be, hogy felbecsüljük a csatornák számát a membránban. Feszültségfüggetlen természetüknek köszönhetően a IKCa1 áramok feszültség-rámpákkal jól mérhetők. A feszültség-rámpák során a membránpotenciál lineárisan nő -120 mV-ról +50 mV-ig, és az áram a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél változik (27. ábra). Nagyobb meredekség több IKCa1 csatorna

jelenlétére utal, azonban a  $K^+$ -ra specifikus áramkomponens teljes körű meghatározása a megfordítási potenciál mérését is igényli.

A legtöbb sejt esetében Charybdotoxint (ChTX) is alkalmaztunk, a  $Kv1.3$  és  $IKCa1$  csatornák elkülönítésére, amely mindkét membránfehérje gátlószere alacsony nanomoláris koncentrációkban [77, 78]. Az extracelluláris térben alkalmazott 50 nM ChTX mindkét típusú csatornát gátolta. A megmaradó áramot, az ún. szivárgási áramot a kontroll áramgörbéből vontuk ki, hogy megkapjuk a  $IKCa1$  komponens (27. ábra). Az áramamplitúdóra és a  $IKCa1$  egyedi csatorna vezetőképességére alapozva (11 pS [192]) becsültük meg a csatornák számát a membránban. Egyik donortípustól származó  $T_{reg}$  és naiv sejtpopuláció között sem találtunk szignifikáns különbséget az  $IKCa1$  csatornák számában (egészséges naiv:  $12,4 \pm 2,4$ , egészséges  $T_{reg}$ :  $21,2 \pm 8,2$ , SM naiv:  $8,7 \pm 2,1$ , SM  $T_{reg}$ :  $22,9 \pm 8,5$  csatorna/sejt).

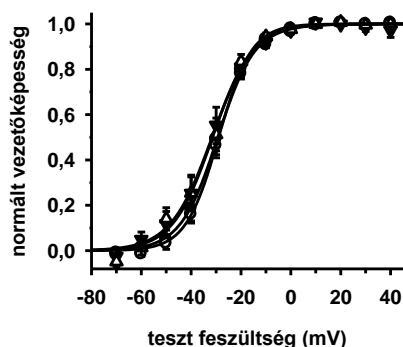
Az alkalmazott feszültségprotokollokkal egyik sejt típus esetén sem találtunk e két  $K^+$  csatornán kívüli más ioncsatornát.



**27. ábra.** A  $IKCa1$  csatornák jelenlétét feszültség-rámpa protokollokkal vizsgáltuk  $-120$  mV-ról  $+50$  mV-ig 180 ms alatt. Nagy  $Ca^{2+}$ -koncentráció mellett a  $IKCa1$  csatornák feszültségtől függetlenül nyitva vannak, és a  $Kv1.3$  csatornák aktivációs küszöbe alatt ezek a csatornák járulnak hozzá az áram-rámpához (ez látható a szaggatott-pontozott vonaltól balra az ábra teljes-sejt áram – idő függésén). A ChTX a  $Kv1.3$  és  $IKCa1$  csatornákat egyaránt gátolja. E peptid toxin 50 nM-os koncentrációban való alkalmazása lehetővé teszi a  $IKCa1$  csatornákon átfolyó  $K^+$ -áram és a nonspecifikus szivárgó áram elkülönítését. Az ábrán látható áramgörbék regisztrálása kontroll körülmények között extracelluláris oldatban, valamint ChTX jelenlétében történt.

A megvizsgált  $Kv1.3$  csatornák kapuzásának egyensúlyi és kinetikus paramétereit összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget az egészséges donoroktól ( $k$ :  $p = 0,567$ ,  $V_{1/2}$ :  $p = 0,632$ ) és a sclerosis multiplexes betegektől származó ( $k$ :  $p = 0,628$ ,  $V_{1/2}$ :  $p = 0,397$ , MWRST)  $T_{reg}$  és naiv sejtek alpopulációi között sem. A négy alpopuláció egyensúlyi

aktivációjának feszültségfüggése látható a 28. ábrán. A 4. táblázat foglalja össze az egyensúlyi aktivációt és az inaktivációt jellemző paramétereket.



**28. ábra.** Normált vezetőképesség a feszültség függvényében. Kv1.3 csatornára vonatkozó G-V görbék a sejtek négy csoportjában. A G-V görbék a 26C ábrán bemutatott feszültség-protokoll alkalmazásával kapott áram-feszültség összefüggésből határoztuk meg a megfordítási potenciál segítségével. A vezetőképesség értékeket a maximális vezetőképesség értékre normáltuk, majd átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk  $n = 10-17$  sejt esetében: egészséges naiv: (●), egészséges  $T_{reg}$  (○), SM naiv (▼), SM  $T_{reg}$  (Δ). Boltzmann-függényt illesztettünk az adatpontokra, majd meghatároztuk a meredekséget valamint a félaktivációs feszültségértéket (4. táblázat).

	Normált vezetőképesség		Inaktiváció (ms)	
	Egészséges donor	Sclerosis multiplex	Egészséges donor	Sclerosis multiplex
Naiv	$V_{1/2} = -29,9 \pm 1,5$ mV $k = 6,3 \pm 0,4$ mV $n = 13$	$V_{1/2} = -29,3 \pm 2,7$ mV $k = 6,7 \pm 0,5$ mV $n = 8$	$\tau_i = 227 \pm 21$ $n = 23$	$\tau_i = 277 \pm 42$ $n = 9$
Regulátor	$V_{1/2} = -28,9 \pm 1,4$ mV $k = 6,0 \pm 0,3$ mV $n = 17$	$V_{1/2} = -29,3 \pm 1,7$ mV $k = 7,1 \pm 0,5$ mV $n = 7$	$250 \pm 17$ $n = 18$	$197 \pm 34$ $n = 14$

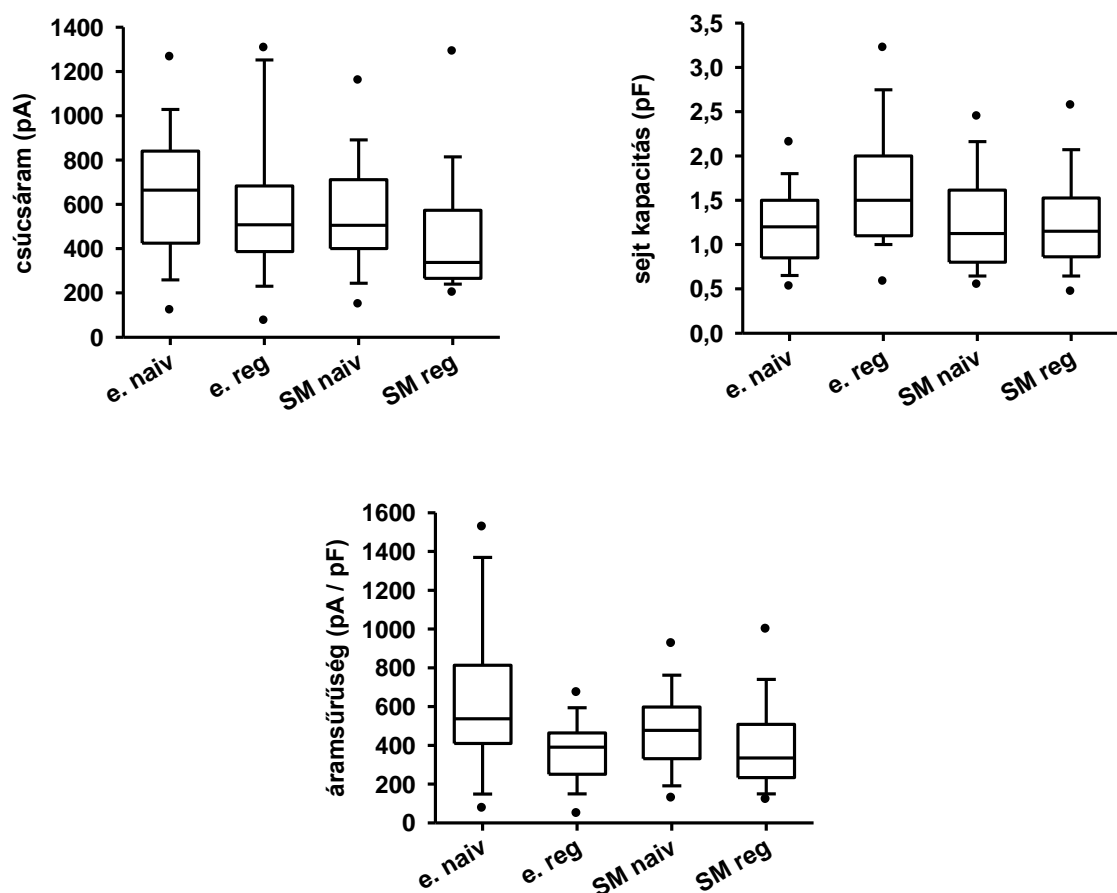
**4. táblázat.** Egészséges donoroktól és sclerosis multiplexes betegektől származó naiv és regulátor T sejteken regisztrált Kv1.3 paraméterek;  $V_{1/2}$ : félaktivációs feszültség,  $k$ : meredekség  $\tau_i$ : inaktivációs időállandó. Az  $n$  érték az egymástól független mérések számát jelzi,

## 5.2.2 Az egészséges donoroktól és sclerosis multiplexes betegektől származó naiv és regulátor T sejtjeinek ioncsatorna expressziós vizsgálata

Mivel nagymértékű eltérések lehetnek a különböző T sejt alpopulációk Kv1.3 expressziós szintjeiben, elsőként a Kv1.3 áramamplitúdókat, vagyis a Kv1.3 csatornák számát hasonlítottuk össze (29A ábra, 5. táblázat). Mivel a SM betegek  $T_{reg}$  sejtjeit csökkent működésűnek írták le, statisztikai elemzésünkben az egészséges és sclerosis multiplexben szenvedő donorok naiv és  $T_{reg}$  sejtjeinek mérési paramétereit terveztük összehasonlítani. Az egészséges egyénektől származó naiv és regulátor T sejtek felületén kifejeződő Kv1.3 csatornák számában nem találtunk különbséget ( $p = 0,125$ , MWRST), azonban a sclerosis multiplexes betegektől izolált sejtpopulációkban a Kv1.3 csatornák száma szignifikánsan kisebbnek bizonyult a naiv sejtekhez képest ( $p = 0,005$ , MWRST).

A T sejtek mérete növekszik aktivációjuk során, amelyet nagyobb felületükből adódó megnövekedett membránkapacitással tudunk detektálni [71]. Méréseinkben összehasonlítottuk a membránkapacitás értékeket (29B ábra, 5. táblázat). Az egészséges donoroktól származó  $T_{reg}$  sejtek membránkapacitása szignifikánsan nagyobb volt naiv párjaikhoz képest ( $p = 0,009$ ), azonban ez a különbség nem volt észlelhető SM betegek  $T_{reg}$  és naiv sejtjei között ( $p = 0,392$ ).

A membránkapacitásra normált áram (áramsűrűség) nyújt információt a csatornák hozzájárulásának mértékéről a membránpotenciál szabályozásához, mivel adott számú csatorna nagyobb mértékben befolyásolja a membránpotenciált egy kisebb sejt esetében, egy nagyobb méretű sejthez képest, megegyező számú csatornával. Az egészséges populáció sejtjei között szignifikáns különbséget találtunk a  $T_{reg}$  és naiv sejteket összehasonlítva ( $p = 0,003$ , MWRST), míg ez a különbség nem jelent meg a SM betegekből származó sejtek altípusai között, amely a naiv sejtekhez viszonyított jelentősen alacsonyabb csatornaszám következménye regulátor T sejtek esetében. Bár az összehasonlítás p-értéke közel van a szignifikancia-szinthez ( $p = 0,052$ ), a naiv és regulátor T sejtek áramsűrűségének aránya egészséges donoroktól származó sejteken végzett mérések alapján 1,71, ami lényegesen magasabb a sclerosis multiplexes donorok 1,29-es aránynál (29C ábra, 5. táblázat).



**29. ábra.** Egészséges naiv (e. naiv), egészséges regulátor (e. reg), valamint sclerosis multiplexes naiv (SM naiv) és sclerosis multiplexes regulátor T sejtek (SM reg) Kv1.3 csúcsáramának, sejt kapacitásának és áramsűrűségének összehasonlítása.

	Csúcsáram (pA)		Kapacitás (pF)		Áramsűrűség (pA/pF)	
	Egészséges donor	Sclerosis multiplex	Egészséges donor	Sclerosis multiplex	Egészséges donor	Sclerosis multiplex
Naiv	644 ± 58 n = 24	590 ± 43 n = 39	1,20 ± 0,09	1,36 ± 0,10	637 ± 82	489 ± 38
Regulátor	566 ± 55 n = 35	438 ± 58 n = 26	1,64 ± 0,12	1,23 ± 0,10	373 ± 31	378 ± 39

**5. táblázat.** Egészséges donoroktól és sclerosis multiplexes betegektől származó naiv és regulátor T sejteken regisztrált csúcsáram, kapacitás és áramsűrűség paraméterek. Az n érték az egymástól független mérések számát jelzi.

## 6 MEGBESZÉLÉS

Elektrofiziológiai méréseink során, a D10 sejtek  $K^+$  áramait biofizikailag és farmakológiailag karakterizálva megállapítottuk, hogy ennek a  $T_H2$  sejtvonalnak a domináns feszültségfüggő  $K^+$  csatornája a Kv1.3. Mivel ki szeretnénk volna zárni a kétpórusú  $K^+$  csatornák jelenlétét, illetve a teljes-sejt áram kinetikájára gyakorolt hatásukat, méréseket kezdtünk a TASK-1 és TASK-3 csatornák D10 sejtvonalon való expressziójára vonatkozóan. A széles körben elfogadott Kv1.3 csatornaspecifikus gátlószer, a Margatoxin a Kv1.3 csatornák több, mint 85%-át gátolja 100 pM-os koncentrációban, míg ugyanez a koncentráció nem eredményezett változást a HEK-tsA sejtekben kifejezett TASK-1 és TASK-3 csatornák esetében. Meuth és munkatársai anandamid és ruténium vörös gátlószereket alkalmaztak a Kv1.3 és TASK áramok elválasztására limfocitákban [155]. Az anandamid alkalmazása során a teljes-sejt áram kinetikájában változást tapasztaltak, ami ahhoz vezethet, hogy a TASK csatornák szelektív blokkolásával a D10 sejtvonal teljes-sejt áram kinetikája is változik. A szakirodalomban eddig nem tanulmányozták ezen molekulák Kv1.3 csatornákra gyakorolt hatását, sőt, a ruténium vörös hatását egyáltalán nem vizsgálták feszültségkapuzott  $K^+$  csatornákra [131, 193, 194]. Ezért megvizsgáltuk TASK csatornák specifikus gátlószereinek HEK-tsA sejtekbe transzfektált Kv1.3 csatornára kifejtett gátlóhatását. A 3  $\mu$ M koncentrációban alkalmazott anandamid valamint a 10  $\mu$ M ruténium vörös a Kv1.3 csatornák áramamplitúdóit is szignifikánsan csökkentette (a Kv1.3 esetében megbecsült  $K_d$  értékek jó egyezést mutatnak a kétpórusú csatornákra leírtakkal), tehát ezek a gátlószerek valójában nem specifikusak, és így a Kv1.3 és a TASK csatornák árama általuk nem különíthető el egyértelműen limfocitákban. Továbbá, mivel a TASK csatornák idő és feszültségfüggetlenek, ezért feszültség-rámpa protokoll segítségével megmértük a teljes-sejt áramokat D10 sejtekben. A feszültség-függő Kv1.3 csatornák eliminálására 100 pM Margatoxint alkalmaztunk, valamint a tartófeszültséget 0 mV-ra állítottuk, mivel a Kv1.3 csatornák ezen feszültségnél inaktiválódnak. A megfordítási potenciált -4 mV-nak határoztuk meg, amely sokkal pozitívabb, mint ami a TASK csatornák jelenlétében várható lett volna (elméleti érték az oldatok összetételének ismeretében -85 mV). Ezek alapján megállapítottuk, hogy a TASK csatornák a D10 sejtek membránjában nem játszanak szerepet a teljes-sejt  $K^+$  áram kinetikai paramétereinek módosításában, mivel azokat a D10 sejtek nem, vagy csak nagyon kis mértékben fejezik ki felületükön.

Korábbi közlemények tanulmányozták, hogy számos rágeszáló T sejtvonalon az ún. „n” és ”l” típusú áramokért is felelős  $K^+$  csatornák is jelen vannak [195, 196]. Nem zárhattuk ki

tehát a Kv3.1 csatornák jelenlétét sem. Míg az előbbi a Kv1.3-nak, addig az utóbbit a Kv3.1 ioncsatornának tulajdonítják [197, 198]. Mindkét csatorna depolarizálással aktiválható, azonban az alapvető biofizikai paramétereik (egyensúlyi aktiváció és inaktiváció) és farmakológiai sajátágaik különbözőek [195]. A TEA és a MgTX dózis-hatás görbéje (15C-D ábra), valamint az illesztés során számított  $K_d$  értékek (TEA: 13,4 mM és MgTX: 16,8 pM) arra utalnak, hogy a Kv1.3 a D10 sejt vonalon meghatározó mértékben jelen lévő feszültségvezérelt  $K^+$ -ioncsatorna. Nem zárhatjuk ki az „n” és „l” típusú csatornák összeszerelődését sem, de 500 pM MgTx jelenlétében (ami kb. harmincszor nagyobb a Kv1.3-ra vonatkozó félhatásos koncentrációnál) a megmaradó áramhányad (3-5%), és a TEA dózis-hatás görbéje azt mutatja, hogy ezek a heteromerek teljes-sejt áramához való hozzájárulása elhanyagolható. Ez a kísérletünk is alátámasztotta a Kv1.3 csatornák kizárólagos jelenlétét.

További tanulmányaink során azt feltételeztük, hogy a D10, T<sub>H</sub>2 sejt vonalon dominánsan expresszálandó Kv1.3 csatornák immunszinapszis kialakulása során bekövetkező átrendeződése hatással lehet a csatornák aktivációs és inaktivációs kapuzására. Mind az egyensúlyi, mind az aktiváció és inaktiváció kinetikus paramétereit megvizsgáltuk, majd az adatokat összehasonlítottuk a T sejtek nyugalmi állapotában mért paramétereivel. A következő eredményeket kaptuk: immunológiai szinapszisban való részvétel során (1) a Kv1.3 csatornák inaktivációs időállandója lecsökken, (2) az aktivációs kinetika lassul, valamint (3) a félaktivációs feszültség szignifikánsan változik (bár a meredekség nem szignifikánsan). A kinetikában bekövetkező változások miatt azt feltételeztük, hogy ennek a jelenségnek a hátterében foszforiláció vagy defoszforiláció áll. Ezt modellezve, protein kináz gátlószerekkel annak a lehetőségét is megvizsgáltuk, hogy a gyorsabb inaktiváció a csatornafehérje foszforilációjának tulajdonítható-e.

Ezen felül, számos korábbi tanulmány vizsgálta a T sejt és az antigénprezentáló sejt között létrejövő immunológiai szinapszisban felhalmozódó citoszolikus és membránfehérjéket, beleértve a Kv1.3 ioncsatornát is [24, 185]. Alátámasztották azt a feltételezést, hogy a D10 és a CH12-LX sejtek között létrejövő immunszinapszis során a sejtek közötti kontaktrégióba való Kv1.3-szegregálódás funkcionális következményekkel járhat, ami valószínűleg a tirozin, szerin vagy treonin aminosav oldalláncok protein kinázok vagy foszfatázok általi módosításainak tulajdoníthatók. Humán perifériás T sejteken végzett PKC és PKA aktivációs kísérletek növekedést mutattak a Kv1.3 teljes-sejt konduktanciában [199, 200]. Továbbá, a PKC működésének pozitív szabályozása a T sejteken jelen lévő Kv1.3 csatornák inaktivációs sebességének csökkenését, míg a PKA aktiváció Kv1.5 csatornák lassúbb inaktivációját eredményezi a Kv $\beta$ 1.3 járulékos alegységet is expresszálandó HEK-tsA

sejtvonalon [199, 201]. Míg a PKC aktivációja az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését is módosítja, addig a PKA csak az egyensúlyi inaktivációt befolyásolja, oly módon, hogy az ún. ablak-áram – amely az ioncsatornák nyugalmi potenciálja körüli nyitási valószínűségét adja meg – szignifikánsan nő. Ugyanakkor olyan tanulmányok is megjelentek, amelyek Jurkat T vagy HEK-tsA sejtekben heterogénean jelen lévő Kv1.3 csatornák teljes vagy részleges gátlását tárgyalják PKA vagy PKC stimuláció által [86, 88]. Receptor és nem-receptor tirozin kinázok aktiválása a Kv1.3 áramot csökkenti, bár a Fas-receptor aktiválása a Kv1.3 aktivációját növeli. Ezek az ellentmondások a PK izoformák különböző expressziós mintázatainak jelenlétének vagy specifikus kapcsoló fehérjék hiányának tulajdoníthatók különböző sejtvonalakban. Mindezek alapján, és a PKA, p56<sup>lck</sup> antagonistákkal végzett kísérleteknek megfelelően feltételezzük, hogy a Kv1.3 ioncsatorna immunológiai szinapszisba való rendeződésekor defoszforilálódik. Ezt a lehetőséget az immunológiai szinapszisban résztvevő D10 sejtek gyorsabb inaktivációs kinetikája és kisebb áramsűrűsége támasztja alá. Azt gondoljuk, hogy a Kv1.3 szinapszisba vándorlása a defoszforiláció előfeltétele. A szinapszisban bekövetkező csatornamódosítás molekuláris mechanizmusa jelenleg nem tisztázott, bár nagy valószínűséggel bizonyos protein foszfatázok magyarázhatják a Kv1.3 áramban bekövetkező változásokat.

A lassúbb aktivációs kinetika és az egyensúlyi aktiváció depolarizáló feszültségek felé való eltolódása a Kv1.3 csatorna mikrokörnyezetében bekövetkező változásokat valószínűsíti, miközben az a szinapszisba szegregál. Ezt a feltevést erősítik a PK antagonistákkal végzett kísérleteink: a PK inhibitorok csak az inaktivációs kinetikát módosítják, az aktiváció sem egyensúlyi, sem kinetikai paramétereinek változásában nem játszanak szerepet. Laboratóriumunk egyik korábbi közleményében Kv1.3 csatornák egy hasonló jelenséget figyelhetünk meg T sejtekben: a membránviszkozitás növelésével, amelyet a membrán koleszterinszintjének növelésével értek el, az aktivációs sebesség csökkent és az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése eltolódott [102].

Elmondhatjuk, hogy a Kv1.3 csatorna immunszinapszisba való vándorlása a csatorna kapuzási paramétereinek megváltozásával jár. A PK inhibitorok használata nem magyarázza egyértelműen a foszforiláció szerepét a csatorna módosításában. Feltételezzük, hogy a jelenséghez a csatornák nagyobb merevségű, rigidebb membrándoménekbe való diffúziója is hozzájárulhat.

A T sejtek nagy populációjának kis csoportját képező regulátor T sejtek tanulmányozása során csatornamintázatbeli különbségeket kerestünk, amely lehetőséget nyújthat a T sejtek e fontos alcsoportjának szelektív manipulálására.

Az általunk vizsgált négy sejtcsoport membránfelületén kifejeződő Kv1.3 és IKCa1 csatornák száma összevethető a korábbi közleményekben leírt nyugvó T sejtek adataival [184], azonban statisztikai elemzéseink azt mutatták, hogy az SM betegektől származó  $T_{reg}$  sejtek kevesebb Kv1.3 csatornát fejeznek ki, összehasonlítva a naiv sejtekkel, és ez a különbség nem mutatható ki egészséges  $T_{reg}$  és naiv sejtek között. T sejtek populációinak mitogén stimulálása egy általános növekedéshez vezet a sejt méretben, ami egyidejűleg egy megnövekedett Kv1.3 és IKCa1 expresszióval is jár [71, 202]. Az általunk vizsgált sejtek nem voltak stimulálva, de az eredmények azt mutatták, hogy az egészséges  $T_{reg}$  sejtek membránfelülete sokkal nagyobb a naiv sejtek felületéhez képest, amellett, hogy a csatornák számában nem tapasztaltunk különbséget, ami a naiv sejtek esetében szignifikánsan nagyobb Kv1.3 csatornasűrűséget eredményezett (pA/pF). Ez összhangban áll azzal az elképzeléssel, hogy  $T_{reg}$  sejtek csak részben vagy nem megfelelően aktiválódnak, és antigén stimuláció hatására anergikusak [203-205]. A megnövekedett membránfelület egyfajta indikátor lehet bizonyos aktivációs útvonalak beindulására, de a megszokott  $K^+$ -csatornaszám növekedésének hiánya hozzájárulhat a T sejt proliferációhoz vezető aktivációs folyamat leállításához.

Egészséges naiv és regulátor T sejteket összehasonlítva a Kv1.3 és a IKCa1 csatornák számában nem találtunk különbséget. A  $K^+$ -csatornák kritikus szereppel bírnak a T sejt aktivációban, ami a  $Ca^{2+}$  ionok beáramlása során a membránpotenciál stabilizálása. Ha a sejt méretének növekedését nem kíséri a  $K^+$  csatornák számának növekedése, az elégtelen membránpotenciál szabályozást eredményez, ami nem megfelelő  $Ca^{2+}$  jelátvitelhez, és csökkent proliferációs hajlamhoz vezet.

Egészséges donoroktól származó sejtekkel ellentétben SM betegekből izolált  $T_{reg}$  sejtek kevesebb Kv1.3 csatornát fejeznek ki, mint a naiv sejtek, továbbá membránfelületük sem nagyobb. A kisebb csatornaszám és sejt méret alapján arra következtetünk, hogy a jelátviteli útvonal során a fehérjeszintézist a betegség olyan módon érinti kedvezőtlenül, hogy akadályozza a  $T_{reg}$  sejtek differenciálódását. Ez a megfigyelés összhangban állhat az SM betegek  $T_{reg}$  sejtjeinek csökkent szuppressziós képességével [163, 164], de ez a kapcsolat további vizsgálatokat igényel.

Szignifikáns különbséget találtunk csatornaszámában, sejt méretben, és csatornasűrűségben, ami a sejtek aktivációs állapotával vagy azzal a képességükkel áll

összefüggésben, hogy mitogén stimulusok aktiválják őket. A  $T_{reg}$  populáció aktivációja során az ioncsatorna-expresszióban és sejtméretben bekövetkező változások további vizsgálatai érdekesek lehetnek az aktivált állapot természetének átfogóbb megismerése szempontjából, valamint nagy jelentőségű lehet annak a lehetőségnek a tanulmányozása is, hogy ezen T sejt alpopuláció hogyan válhat terápiás célponttá, azaz hogyan manipulálható szelektíven farmakológiailag, különböző inhibitorok segítségével a sejtmembránjukon jelen lévő ioncsatornáikon keresztül.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

Patch-clamp technikával, feszültség-zár üzemmódban elvégeztük a D10 sejtek biofizikai és farmakológiai karakterizálását, melynek során a kétpórusú TASK  $K^+$  csatornák jelenlétét kizárva kimutattuk, hogy ezen egér  $T_H2$  sejtvonal domináns feszültség-függő  $K^+$  csatornája a Kv1.3.

A CH12-LX antigénprezentáló sejteket felhasználva beállítottunk egy modellrendszert az immunológiai szinapszis tanulmányozására. Az endogén Kv1.3 csatornákat extracelluláris epitóp ellen termeltetett antitesttel, indirekt módszerrel jelöltük meg, majd meghatároztuk a Kv1.3 csatornák sejtfelszíni eloszlását az immunológiai szinapszis kialakulását követően. Konfokális mikroszkópos felvételeink kimutatták, hogy a T sejtek Kv1.3 ioncsatornái a két sejt közötti kontaktrégióba rendeződnek.

Összehasonlítottuk az egyedülálló és a szinapszisban lévő T sejtek Kv1.3 áramait, megállapítottuk hogy az aktivációs kinetika lelassult, ezzel szemben az áram inaktivációja felgyorsult a szinapszisban lévő sejtekben az egyedülálló sejtekhez képest, de a Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának membránpotenciál-függését jellemző normált konduktancia–tesztpotenciál összefüggés nem változott szignifikáns mértékben.

Azért, hogy ennek a háttérét minél jobban megismerjük a D10 sejteket PKA, PKC és  $p56^{lck}$  gátlószerekkel kezeltük. Az aktivációs kinetikát jellemző időállandó és a normált konduktancia feszültségfüggését jellemző paraméterek nem különböztek jelentősen a kezelt és a kezeletlen sejtek között, azonban az inaktivációs időállandókban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kezelések hatására, azaz az áram inaktivációja felgyorsult, amely feltételezéseink szerint a csatorna szinapszisbeli defoszforilációjával hozható összefüggésbe.

Továbbá, szintén teljes-sejt konfigurációban megvizsgáltuk az egészséges és sclerosis multiplexes donoroktól származó naiv és regulátor T sejtek ioncsatorna-expressziós mintázatát. Megmértük az egyes sejteken található Kv1.3 és IKCa1 csatornák számát, valamint megvizsgáltuk a kapuzására vonatkozó paramétereket is, majd statisztikai összehasonlítást végeztünk a különböző populációk között. Megállapítottuk, hogy az egészséges donorok naiv és  $T_{reg}$  sejtjei azonos számú Kv1.3 csatornát fejeznek ki, ugyanakkor a  $T_{reg}$  sejtek membránkapacitása nagyobbak bizonyult, mint a naiv sejtéké, és így csatornadenzitásuk alacsonyabbnak adódott. Ezzel szemben, a sclerosis multiplexes betegek  $T_{reg}$  sejtjei kevesebb Kv1.3 csatornával rendelkeztek, mint a naiv sejtek, és membránfelszínük sem volt nagyobb a naiv sejtékénél.

## 8 SUMMARY

We carried out biophysical and pharmacological characterization of whole-cell  $K^+$  current in D10 cells by patch-clamp technique in voltage-clamp mode. Excluding the presence of the two-pore TASK channels, we pointed out that this  $T_H2$  murine cell line predominantly expresses Kv1.3 channels.

Using the CH12-LX cell line as antigen presenting cells we set a model system for studying the immunological synapse. We determined the cell surface distribution of Kv1.3 channels after the formation of the immunological synapse by labeling endogenous Kv1.3 channels against their extracellular epitope indirectly. Our confocal microscopy images demonstrated that Kv1.3 channels of these T cells accumulate in the contact region of the T cell – APC conjugate.

We compared the Kv1.3 currents, kinetic and steady-state parameters measured in standalone and APC-engaged cells. We found that activation kinetics slowed down, while inactivation rate increased in cells participating in the immune synapse, and we did not find significant difference in voltage-dependence of steady-state activation between standalone and T cells in the immunological synapse by plotting the normalized conductance as a function of test potential.

To clarify its background we applied PKA, PKC and p56<sup>lck</sup> inhibitors. The activation kinetics and the voltage-dependence of steady-state activation were not altered by PK inhibitors, however, our statistical comparison proved that the decrease in inactivation time constant was significant in treated cells compared to the control group. We suppose this phenomenon to be associated with the dephosphorylation of the channel protein in the immunological synapse.

Furthermore, we investigated the pattern of ion channel expression of naïve and regulatory T cells isolated from healthy volunteers and from patients with multiple sclerosis. We measured the numbers of the voltage-gated Kv1.3 and the  $Ca^{2+}$ -activated IKCa1 channels, studied the gating of these channels, then we performed a statistical analysis among the different populations. Although, we did not find significant difference in gating parameters of Kv1.3 and the number of IKCa1 channels, we determined that the naïve and regulatory T cells of healthy donors express the same amount of Kv1.3 channels, and that the membrane capacitance is higher of regulatory T cells, thus the channel density is lower, while the  $T_{reg}$  population from MS patients expresses fewer Kv1.3 channels and their surface is not significantly larger compared to their naïve counterparts.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Gergely, J. and A. Erdei, *Immunbiológia* 2006.
2. Vila, J., J.D. Isaacs, and A.E. Anderson, *Regulatory T cells and autoimmunity*. *Curr Opin Hematol*, 2009. **16**(4): p. 274-9.
3. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. *Science*, 2000. **290**(5489): p. 92-7.
4. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
5. Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines*. *Blood*, 2003. **101**(11): p. 4260-6.
6. Gunzer, M., et al., *Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential*. *Immunity*, 2000. **13**(3): p. 323-32.
7. Harris, N.L., et al., *Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 317-26.
8. Sallusto, F., et al., *Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(6): p. 2037-45.
9. Kishimoto, T.K., M.A. Jutila, and E.C. Butcher, *Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(6): p. 2244-8.
10. Chao, C.C., R. Jensen, and M.O. Dailey, *Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells*. *J Immunol*, 1997. **159**(4): p. 1686-94.
11. Zweifach, A. and R.S. Lewis, *Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(13): p. 6295-9.
12. Prakriya, M. and R.S. Lewis, *CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity*. *Cell Calcium*, 2003. **33**(5-6): p. 311-21.
13. Bromley, S.K., et al., *The immunological synapse*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 375-96.
14. van der Merwe, P.A., *Formation and function of the immunological synapse*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(3): p. 293-8.
15. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. *Nature*, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
16. Bachmann, M.F., et al., *Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation*. *Immunity*, 1997. **7**(4): p. 549-57.
17. Davis, D.M., *Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(7): p. 356-63.
18. Dustin, M.L., *The cellular context of T cell signaling*. *Immunity*, 2009. **30**(4): p. 482-92.

19. Bachmann, M.F., M. Barner, and M. Kopf, *CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1383-92.
20. Espagnolle, N., et al., *CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase Cgamma1/calcium pathway at the immunological synapse*. Int Immunol, 2007. **19**(3): p. 239-48.
21. Fooksman, D.R., et al., *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation*. Annu Rev Immunol. **28**: p. 79-105.
22. Panyi, G., et al., *Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2592-7.
23. Panyi, G., et al., *Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1285-90.
24. 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.
25. Nicolaou, S.A., et al., *The Ca(2+)-activated K(+) channel KCa3.1 compartmentalizes in the immunological synapse of human T lymphocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1431-9.
26. Rus, H., et al., *The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11094-9.
27. Lioudyno, M.I., et al., *Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2011-6.
28. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes*. Immunol Rev, 2009. **231**(1): p. 59-87.
29. Lewis, R.S. and M.D. Cahalan, *Potassium and calcium channels in lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 623-53.
30. Lewis, R.S., *Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 497-521.
31. Matteson, D.R. and C. Deutsch, *K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion*. Nature, 1984. **307**(5950): p. 468-71.
32. Fanger, C.M., A.L. Neben, and M.D. Cahalan, *Differential Ca<sup>2+</sup> influx, KCa channel activity, and Ca<sup>2+</sup> clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1153-60.
33. Leonard, R.J., et al., *Selective blockers of voltage-gated K<sup>+</sup> channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10094-8.
34. Fanger, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12249-56.

35. Panyi, G., et al., *Immunosuppressors inhibit voltage-gated potassium channels in human peripheral blood lymphocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **221**(2): p. 254-8.
36. Deutsch, C., *K<sup>+</sup> channels and mitogenesis*. *Prog Clin Biol Res*, 1990. **334**: p. 251-71.
37. Koo, G.C., et al., *Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo*. *J Immunol*, 1997. **158**(11): p. 5120-8.
38. Price, M., S.C. Lee, and C. Deutsch, *Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(24): p. 10171-5.
39. Kalman, K., et al., *ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32697-707.
40. Garcia, M.L., et al., *Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure*. *Toxicon*, 2001. **39**(6): p. 739-48.
41. DeCoursey, T.E., et al., *Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?* *Nature*, 1984. **307**(5950): p. 465-8.
42. Chandy, K.G., *Simplified gene nomenclature*. *Nature*, 1991. **352**(6330): p. 26.
43. MacKinnon, R., *Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel*. *Nature*, 1991. **350**(6315): p. 232-5.
44. Chapman, M.L., H.S. Krovetz, and A.M. VanDongen, *GYGD pore motifs in neighbouring potassium channel subunits interact to determine ion selectivity*. *J Physiol*, 2001. **530**(Pt 1): p. 21-33.
45. Ranganathan, R., J.H. Lewis, and R. MacKinnon, *Spatial localization of the K<sup>+</sup> channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis*. *Neuron*, 1996. **16**(1): p. 131-9.
46. MacKinnon, R. and C. Miller, *Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor*. *Science*, 1989. **245**(4924): p. 1382-5.
47. Heginbotham, L. and R. MacKinnon, *The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels*. *Neuron*, 1992. **8**(3): p. 483-91.
48. Yellen, G., et al., *Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel*. *Science*, 1991. **251**(4996): p. 939-42.
49. MacKinnon, R., L. Heginbotham, and T. Abramson, *Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor*. *Neuron*, 1990. **5**(6): p. 767-71.
50. Ledwell, J.L. and R.W. Aldrich, *Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation*. *J Gen Physiol*, 1999. **113**(3): p. 389-414.
51. Bezanilla, F., *The voltage sensor in voltage-dependent ion channels*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(2): p. 555-92.
52. Larsson, H.P., et al., *Transmembrane movement of the shaker K<sup>+</sup> channel S4*. *Neuron*, 1996. **16**(2): p. 387-97.

53. Baker, O.S., et al., *Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K<sup>+</sup> channel gating*. *Neuron*, 1998. **20**(6): p. 1283-94.
54. Aziz, Q.H., et al., *Depolarization induces intersubunit cross-linking in a S4 cysteine mutant of the Shaker potassium channel*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(45): p. 42719-25.
55. Cahalan, M.D., et al., *A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes*. *J Physiol*, 1985. **358**: p. 197-237.
56. Pahapill, P.A. and L.C. Schlichter, *Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes*. *J Physiol*, 1992. **445**: p. 407-30.
57. Panyi, G., et al., *Peripheral blood lymphocytes display reduced K<sup>+</sup> channel activity in aged humans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **199**(2): p. 519-24.
58. Lee, T.E., L.H. Philipson, and D.J. Nelson, *N-type inactivation in the mammalian Shaker K<sup>+</sup> channel Kv1.4*. *J Membr Biol*, 1996. **151**(3): p. 225-35.
59. Panyi, G., Z. Sheng, and C. Deutsch, *C-type inactivation of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel occurs by a cooperative mechanism*. *Biophys J*, 1995. **69**(3): p. 896-903.
60. Ogielska, E.M., et al., *Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels*. *Biophys J*, 1995. **69**(6): p. 2449-57.
61. Hoshi, T., W.N. Zagotta, and R.W. Aldrich, *Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation*. *Science*, 1990. **250**(4980): p. 533-8.
62. Lopez-Barneo, J., et al., *Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels*. *Receptors Channels*, 1993. **1**(1): p. 61-71.
63. Choi, K.L., R.W. Aldrich, and G. Yellen, *Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(12): p. 5092-5.
64. Rasmusson, R.L., et al., *Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels*. *Circ Res*, 1998. **82**(7): p. 739-50.
65. Kurata, H.T. and D. Fedida, *A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006. **92**(2): p. 185-208.
66. Loots, E. and E.Y. Isacoff, *Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K<sup>+</sup> channel*. *J Gen Physiol*, 1998. **112**(4): p. 377-89.
67. Loots, E. and E.Y. Isacoff, *Molecular coupling of S4 to a K(+) channel's slow inactivation gate*. *J Gen Physiol*, 2000. **116**(5): p. 623-36.
68. Grissmer, S. and M. Cahalan, *TEA prevents inactivation while blocking open K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes*. *Biophys J*, 1989. **55**(1): p. 203-6.
69. Verheugen, J.A., et al., *Voltage-gated and Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential, and intracellular calcium*. *J Gen Physiol*, 1995. **105**(6): p. 765-94.
70. Chandy, K.G., et al., *Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation*. *J Exp Med*, 1984. **160**(2): p. 369-85.
71. Deutsch, C., D. Krause, and S.C. Lee, *Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester*. *J Physiol*, 1986. **372**: p. 405-23.

72. Gaspar, R., Jr., et al., *Effect of acetylcholine on the electrophysiology and proliferative response of human lymphocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **226**(2): p. 303-8.
73. Varga, Z., et al., *The effect of juglone on the membrane potential and whole-cell K<sup>+</sup> currents of human lymphocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **218**(3): p. 828-32.
74. Peter, M., Jr., et al., *Pandinus imperator scorpion venom blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human lymphocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **242**(3): p. 621-5.
75. Peter, M., Jr., et al., *Blockage of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **278**(1): p. 34-7.
76. Peter, M., Jr., et al., *Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24*. *J Membr Biol*, 2001. **179**(1): p. 13-25.
77. Sands, S.B., R.S. Lewis, and M.D. Cahalan, *Charybdotoxin blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human and murine T lymphocytes*. *J Gen Physiol*, 1989. **93**(6): p. 1061-74.
78. Grissmer, S., A.N. Nguyen, and M.D. Cahalan, *Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology*. *J Gen Physiol*, 1993. **102**(4): p. 601-30.
79. Crest, M., et al., *Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2<sup>+</sup>)-activated K<sup>+</sup> channels characterized from Androctonus mauretanicus mauretanicus venom*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(3): p. 1640-7.
80. Garcia, M.L., et al., *Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from Leiurus quinquestriatus var. hebraeus venom*. *Biochemistry*, 1994. **33**(22): p. 6834-9.
81. Rochat, H., et al., *Maurotoxin, a four disulfide bridges scorpion toxin acting on K<sup>+</sup> channels*. *Toxicon*, 1998. **36**(11): p. 1609-11.
82. Lebrun, B., et al., *A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from Heterometrus spinnifer (Scorpionidae) venom*. *Biochem J*, 1997. **328** ( Pt 1): p. 321-7.
83. Swartz, K.J. and R. MacKinnon, *Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels*. *Neuron*, 1997. **18**(4): p. 675-82.
84. Krasznai, Z., *Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005. **53**(2): p. 127-35.
85. Panyi, G., Z. Varga, and R. Gaspar, *Ion channels and lymphocyte activation*. *Immunol Lett*, 2004. **92**(1-2): p. 55-66.
86. Payet, M.D. and G. Dupuis, *Dual regulation of the n type K<sup>+</sup> channel in Jurkat T lymphocytes by protein kinases A and C*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(26): p. 18270-3.
87. Cai, Y.C. and J. Douglass, *In vivo and in vitro phosphorylation of the T lymphocyte type n (Kv1.3) potassium channel*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(31): p. 23720-7.
88. Martel, J., et al., *The sensitivity of the human Kv1.3 (hKv1.3) lymphocyte K<sup>+</sup> channel to regulation by PKA and PKC is partially lost in HEK 293 host cells*. *J Membr Biol*, 1998. **161**(2): p. 183-96.

89. Bowlby, M.R., et al., *Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases*. J Gen Physiol, 1997. **110**(5): p. 601-10.
90. Colley, B., K. Tucker, and D.A. Fadool, *Comparison of modulation of Kv1.3 channel by two receptor tyrosine kinases in olfactory bulb neurons of rodents*. Receptors Channels, 2004. **10**(1): p. 25-36.
91. Holmes, T.C., D.A. Fadool, and I.B. Levitan, *Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel*. J Neurosci, 1996. **16**(5): p. 1581-90.
92. Panyi, G., *Biophysical and pharmacological aspects of K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes*. Eur Biophys J, 2005. **34**(6): p. 515-29.
93. Szabo, I., et al., *Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel in T lymphocytes upon Fas stimulation*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20465-9.
94. Bock, J., et al., *Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(4): p. 890-7.
95. Chandy, K.G., et al., *K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(5): p. 280-9.
96. Hanada, T., et al., *Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to p56lck tyrosine kinase and Shaker type Kv1.3 potassium channel in T lymphocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 26899-904.
97. McCormack, T., et al., *The effects of Shaker beta-subunits on the human lymphocyte K<sup>+</sup> channel Kv1.3*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20123-6.
98. Gong, J., et al., *Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2*. Science, 1999. **285**(5433): p. 1565-9.
99. Janes, P.W., et al., *The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling*. Semin Immunol, 2000. **12**(1): p. 23-34.
100. Martens, J.R., et al., *Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7443-6.
101. Martens, J.R., et al., *Isoform-specific localization of voltage-gated K<sup>+</sup> channels to distinct lipid raft populations. Targeting of Kv1.5 to caveolae*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8409-14.
102. Hajdu, P., et al., *Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes*. Pflugers Arch, 2003. **445**(6): p. 674-82.
103. Lesage, F. and M. Lazdunski, *Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(5): p. F793-801.
104. Millar, J.A., et al., *A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3614-8.
105. Lesage, F., et al., *TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure*. Embo J, 1996. **15**(5): p. 1004-11.
106. Rajan, S., et al., *TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histidine as pH sensor*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16650-7.

107. Morton, M.J., et al., *Determinants of pH sensing in the two-pore domain K(+) channels TASK-1 and -2*. Pflugers Arch, 2003. **445**(5): p. 577-83.
108. Duprat, F., et al., *TASK, a human background K+ channel to sense external pH variations near physiological pH*. Embo J, 1997. **16**(17): p. 5464-71.
109. Kim, Y., H. Bang, and D. Kim, *TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9340-7.
110. Meadows, H.J. and A.D. Randall, *Functional characterisation of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel*. Neuropharmacology, 2001. **40**(4): p. 551-9.
111. Czirjak, G. and P. Enyedi, *Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5426-32.
112. Clarke, C.E., et al., *Selective block of the human 2-P domain potassium channel, TASK-3, and the native leak potassium current, IKSO, by zinc*. J Physiol, 2004. **560**(Pt 1): p. 51-62.
113. Clarke, C.E., et al., *The MIP1 loop of TASK3 K2P channels apposes the selectivity filter and influences channel function*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 16985-92.
114. Czirjak, G. and P. Enyedi, *Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(3): p. 646-52.
115. Musset, B., et al., *Effects of divalent cations and spermine on the K+ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons*. J Physiol, 2006. **572**(Pt 3): p. 639-57.
116. Kang, D., et al., *Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells*. J Physiol, 2004. **554**(Pt 1): p. 64-77.
117. Kim, D., et al., *Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K+ channel in rat carotid body glomus cells*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 12): p. 2963-75.
118. Berg, A.P., et al., *Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K+ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits*. J Neurosci, 2004. **24**(30): p. 6693-702.
119. Larkman, P.M. and E.M. Perkins, *A TASK-like pH- and amine-sensitive 'leak' K+ conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(3): p. 679-91.
120. Meuth, S.G., et al., *The contribution of TWIK-related acid-sensitive K+-containing channels to the function of dorsal lateral geniculate thalamocortical relay neurons*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(4): p. 1468-76.
121. Torborg, C.L., et al., *TASK-like conductances are present within hippocampal CA1 stratum oriens interneuron subpopulations*. J Neurosci, 2006. **26**(28): p. 7362-7.
122. Maingret, F., et al., *The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1*. Embo J, 2001. **20**(1-2): p. 47-54.
123. Fearon, I.M., et al., *GABA mediates autoreceptor feedback inhibition in the rat carotid body via presynaptic GABAB receptors and TASK-1*. J Physiol, 2003. **553**(Pt 1): p. 83-94.

124. Gurney, A.M., et al., *Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2003. **93**(10): p. 957-64.
125. Putzke, C., et al., *Differential effects of volatile and intravenous anesthetics on the activity of human TASK-1*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(4): p. C1319-26.
126. Aller, M.I., et al., *Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons*. *J Neurosci*, 2005. **25**(49): p. 11455-67.
127. Veale, E.L., et al., *Identification of a region in the TASK3 two pore domain potassium channel that is critical for its blockade by methanandamide*. *Br J Pharmacol*, 2007. **152**(5): p. 778-86.
128. Kim, H.I., et al., *Anandamide suppression of Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons*. *Brain Res*, 2005. **1062**(1-2): p. 39-47.
129. Zygmunt, P.M., et al., *Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide*. *Nature*, 1999. **400**(6743): p. 452-7.
130. Chemin, J., et al., *Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide*. *Embo J*, 2001. **20**(24): p. 7033-40.
131. Poling, J.S., et al., *Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K<sup>+</sup> channels*. *Neuropharmacology*, 1996. **35**(7): p. 983-91.
132. Enyedi, P. and G. Czirjak, *Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(2): p. 559-605.
133. Czirjak, G., et al., *TASK (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(6): p. 863-74.
134. Brickley, S.G., et al., *Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance*. *Nature*, 2001. **409**(6816): p. 88-92.
135. Medhurst, A.D., et al., *Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001. **86**(1-2): p. 101-14.
136. Patel, A.J., et al., *Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels*. *Nat Neurosci*, 1999. **2**(5): p. 422-6.
137. Sirois, J.E., et al., *The TASK-1 two-pore domain K<sup>+</sup> channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics*. *J Neurosci*, 2000. **20**(17): p. 6347-54.
138. Duprat, F., et al., *The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK*. *Mol Pharmacol*, 2000. **57**(5): p. 906-12.
139. Buckler, K.J., B.A. Williams, and E. Honore, *An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells*. *J Physiol*, 2000. **525 Pt 1**: p. 135-42.
140. Bayliss, D.A., et al., *TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons*. *Respir Physiol*, 2001. **129**(1-2): p. 159-74.
141. Talley, E.M., et al., *Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family*. *J Neurosci*, 2001. **21**(19): p. 7491-505.

142. Gardener, M.J., et al., *Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries*. Br J Pharmacol, 2004. **142**(1): p. 192-202.
143. Olschewski, A., et al., *Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 2006. **98**(8): p. 1072-80.
144. Lin, W., et al., *Taste receptor cells express pH-sensitive leak K<sup>+</sup> channels*. J Neurophysiol, 2004. **92**(5): p. 2909-19.
145. Talley, E.M., et al., *TASK-1, a two-pore domain K<sup>+</sup> channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 399-410.
146. Karschin, C., et al., *Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system*. Mol Cell Neurosci, 2001. **18**(6): p. 632-48.
147. Brickley, S.G., et al., *TASK-3 two-pore domain potassium channels enable sustained high-frequency firing in cerebellar granule neurons*. J Neurosci, 2007. **27**(35): p. 9329-40.
148. Burdakov, D., et al., *Tandem-pore K<sup>+</sup> channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose*. Neuron, 2006. **50**(5): p. 711-22.
149. Kim, Y., et al., *Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K<sup>+</sup> channels by pressure, free fatty acids and alkali*. Pflugers Arch, 2001. **442**(1): p. 64-72.
150. Putzke, C., et al., *The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(1): p. 59-68.
151. Barbuti, A., et al., *Block of the background K(+) channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2024-30.
152. Bayliss, D.A., J.E. Sirois, and E.M. Talley, *The TASK family: two-pore domain background K<sup>+</sup> channels*. Mol Interv, 2003. **3**(4): p. 205-19.
153. Davies, L.A., et al., *TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2203-8.
154. Perez-Garcia, M.T., et al., *Viral gene transfer of dominant-negative Kv4 construct suppresses an O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> current in chemoreceptor cells*. J Neurosci, 2000. **20**(15): p. 5689-95.
155. Meuth, S.G., et al., *TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) and TASK3 critically influence T lymphocyte effector functions*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14559-70.
156. Lauritzen, I., et al., *K<sup>+</sup>-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K<sup>+</sup> channels*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32068-76.
157. Yu, S.P., *Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis*. Prog Neurobiol, 2003. **70**(4): p. 363-86.
158. Mu, D., et al., *Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 297-302.
159. Kovacs, I., et al., *TASK-3 immunoreactivity shows differential distribution in the human gastrointestinal tract*. Virchows Arch, 2005. **446**(4): p. 402-10.

160. Kim, D., et al., *Arachidonic acid activation of a new family of K<sup>+</sup> channels in cultured rat neuronal cells*. J Physiol, 1995. **484** ( Pt 3): p. 643-60.
161. Prieto, G.A. and Y. Rosenstein, *Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation*. Immunology, 2006. **118**(1): p. 58-65.
162. Schumacher, A., et al., *Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy*. Obstet Gynecol, 2007. **110**(5): p. 1137-45.
163. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
164. Haas, J., et al., *Reduced suppressive effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis*. Eur J Immunol, 2005. **35**(11): p. 3343-52.
165. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
166. Bluestone, J.A., Q. Tang, and C.E. Sedwick, *T regulatory cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects*. J Clin Immunol, 2008. **28**(6): p. 677-84.
167. Sasada, T., et al., *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression*. Cancer, 2003. **98**(5): p. 1089-99.
168. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.
169. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
170. Baecher-Allan, C., et al., *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
171. Wood, K.J. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in transplantation tolerance*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 199-210.
172. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
173. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
174. Li, J., G. Huston, and S.L. Swain, *IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1807-15.
175. Fuller, M.J., et al., *Cutting edge: emergence of CD127<sup>high</sup> functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 5926-30.
176. Lopez-Diego, R.S. and H.L. Weiner, *Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(11): p. 909-25.
177. Bruserud, O., et al., *Anticancer immunotherapy in combination with proapoptotic therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(8): p. 666-75.

178. Drachman, D.B., et al., *Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation*. N Engl J Med, 1978. **298**(20): p. 1116-22.
179. Lennon, V.A., *Immunology of the acetylcholine receptor*. Immunol Commun, 1976. **5**(4): p. 323-44.
180. Lang, B., et al., *Antibodies to motor nerve terminals: an electrophysiological study of a human myasthenic syndrome transferred to mouse*. J Physiol, 1983. **344**: p. 335-45.
181. Shillito, P., et al., *Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K<sup>+</sup> channels of peripheral nerves*. Ann Neurol, 1995. **38**(5): p. 714-22.
182. Lee, E.K., et al., *Morvan's fibrillary chorea: a paraneoplastic manifestation of thymoma*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998. **65**(6): p. 857-62.
183. Gultekin, S.H., et al., *Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients*. Brain, 2000. **123** ( Pt 7): p. 1481-94.
184. Wulff, H., et al., *The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS*. J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1703-13.
185. Nicolaou, S.A., et al., *Altered dynamics of Kv1.3 channel compartmentalization in the immunological synapse in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 346-56.
186. Nicolaou, S.A., et al., *Localization of Kv1.3 channels in the immunological synapse modulates the calcium response to antigen stimulation in T lymphocytes*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6296-302.
187. Pennington, M.W., et al., *Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone*. Int J Pept Protein Res, 1995. **46**(5): p. 354-8.
188. Dunham, R.M., et al., *CD127 and CD25 expression defines CD4<sup>+</sup> T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5582-92.
189. Gutman, G.A., et al., *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 473-508.
190. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
191. Hoshi, T., W.N. Zagotta, and R.W. Aldrich, *Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region*. Neuron, 1991. **7**(4): p. 547-56.
192. Logsdon, N.J., et al., *A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32723-6.
193. Amoros, I., et al., *Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(1): p. 201-10.
194. Barana, A., et al., *Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 56-67.

195. Decoursey, T.E., et al., *Two types of potassium channels in murine T lymphocytes*. J Gen Physiol, 1987. **89**(3): p. 379-404.
196. Decoursey, T.E., et al., *Mitogen induction of ion channels in murine T lymphocytes*. J Gen Physiol, 1987. **89**(3): p. 405-20.
197. Grissmer, S., et al., *The Shaw-related potassium channel gene, Kv3.1, on human chromosome 11, encodes the type I K<sup>+</sup> channel in T cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 20971-9.
198. Spencer, R.H., K.G. Chandy, and G.A. Gutman, *Immunological identification of the Shaker-related Kv1.3 potassium channel protein in T and B lymphocytes, and detection of related proteins in flies and yeast*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **191**(1): p. 201-6.
199. Chung, I. and L.C. Schlichter, *Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C*. J Membr Biol, 1997. **156**(1): p. 73-85.
200. Chung, I. and L.C. Schlichter, *Regulation of native Kv1.3 channels by cAMP-dependent protein phosphorylation*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. C622-33.
201. Kwak, Y.G., et al., *Protein kinase A phosphorylation alters Kvbeta1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 13928-32.
202. Beeton, C., et al., *Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13942-7.
203. Fisson, S., et al., *Continuous activation of autoreactive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the steady state*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 737-46.
204. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
205. von Herrath, M.G. and L.C. Harrison, *Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 223-32.

## 10 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/286/2012.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Tóth Ágnes

Neptun kód: C86PNG

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Hajdú, P., Szilágyi, O., **Tóth, Á.**, Krasznai, Z., Pocsai, K., Panyi, G.: Answer to the "comment on functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse" by Stefan Bittner et al. [Immunol. Lett. 125 (Aug 15 (2)) (2009) 156-157].  
*Immunol. Lett.* 129 (1), 47-49, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.12.026>  
IF:2.511
2. **Tóth, Á.**, Szilágyi, O., Krasznai, Z., Panyi, G., Hajdú, P.: Functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse.  
*Immunol. Lett.* 125 (1), 15-21, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.05.004>  
IF:2.906
3. Varga, Z., Csépany, T., Papp, F., Fábrián, Á., Gogolák, P., **Tóth, Á.**, Panyi, G.: Potassium channel expression in human CD4(+) regulatory and naive T cells from healthy subjects and multiple sclerosis patients.  
*Immunol. Lett.* 124 (2), 95-101, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.04.008>  
IF:2.906



## 11 TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

---

### További Közlemények

4. Krasznai, Z.T., **Tóth, Á.**, Mikecz, P., Fodor, Z., Szabó, G., Galuska, L., Hernádi, Z., Goda, K.: Pgp inhibition by UIC2 antibody can be followed in vitro by using tumor-diagnostic radiotracers, <sup>99m</sup>Tc-MIBI and <sup>18</sup>FDG.

*Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (5), 665-669, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.009>

IF:3.291

5. Mikecz, P., Márián, T., Miklovicz, T., Galuska, L., Krasznai, Z., **Tóth, Á.**, Goda, K., Trón, L., Hernádi, Z., Krasznai, Z.T.: Daunorubicin and doxorubicin inhibit the [(11)C]choline accumulation in cancer cells.

*Appl. Radiat. Isot.* 67 (10), 1806-1811, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.07.007>

IF:1.094

**Összesített impakt faktor: 12.708**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 8.323**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.09.28



## 12 ELŐADÁS ÉS POSZTER PREZENTÁCIÓK

### Előadás:

Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a modulator and the UIC2 monoclonal antibody

Bridges in Life Sciences US-CEE Regional Networking Meeting IV, Debrecen, Hungary, 4 April, 2009

### Poszter prezentációk:

1. Péter Hajdú, Kata Ludányi, Emese Zsiros, **Ágnes Tóth**, Miklós Bagdány, Rezső Gáspár, Éva Rajnavölgyi, György Panyi  
Change in ion channel expression of human dendritic cells during maturation  
14<sup>th</sup> efis-EJI Symposium on Signals and Signal Processing in The Immune System, Balatonöszöd, Hungary , 15-19 September, 2007
2. Szilágyi Orsolya, **Tóth Ágnes**, Bartók Ádám, Krasznai Zoltán, Pocsai Krisztina, Panyi György, Hajdú Péter  
Fluoreszcens fehérjével konjugált Kv1.3 csatornák komparatív vizsgálata  
38. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2008. május 20-23.
3. **Ágnes Tóth**, Orsolya Szilágyi, Ákos Fábián, Zoltán Krasznai, György Panyi, Péter Hajdú  
Functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse  
8<sup>th</sup> EFIS-EJI Tatra Immunological Conference, Molecular Determinants of T Cell Immunity, Strbské Pleso, Slovakia, 7-10 June, 2008
4. Ferenc Papp, **Ágnes Tóth**, Orsolya Szilágyi, Sándor Damjanovich, György Panyi  
Oscillation of the Membrane Potential of T-cells Forming Immunological Synapse  
Biophysical Society 53<sup>rd</sup> Annual Meeting, Boston, USA, 28 February – 4 March, 2009

5. Fodor Zoltán, Márián Teréz, Mikecz Pál, Galuska László, Goda Katalin, **Tóth Ágnes**, Szabó Gábor Jr., Hernádi Zoltán, Krasznai Zoárd T.  
A P-gp pumpa kombinált kezeléssel történő blokkolása megváltoztatja a  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI és az  $^{18}\text{F}$ FDG tumordiagnosztikai tracerek akkumulációját multidrog rezisztens sejteken  
Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság (MONT) XVI. Kongresszusa, Debrecen, 2009. július 2-4.
6. Mikecz Pál, Márián Teréz, Miklovicz Tünde, Galuska László, Krasznai Zoltán, **Tóth Ágnes**, Goda Katalin, Trón Lajos, Hernádi Zoltán, Krasznai Zoárd T.  
Az antraciklin származékok hatása rákos sejtek ( $^{11}\text{C}$ )kolin és ( $^{18}\text{F}$ )FDG felvételére  
Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság (MONT) XVI. Kongresszusa, Debrecen, 2009. július 2-4.
7. **Ágnes Tóth**, Stefan Sunzenauer, Markus Axmann, Péter Hajdú, György Panyi, Gerhard J. Schütz  
Co-localization and putative interaction of Kv1.3 ion channels with CD3 molecules in the immunological synapse  
XII. Annual Linz Winter Workshop, Advances in Single-Molecule Research for Biology & Nanoscience, Linz, Austria, 5-8 February, 2010
8. Katalin Goda, **Ágnes Tóth**, Gábor Szalóki, István Juhász, Laura Vízkeleti, Attila Szöllősi, Teréz Márián, Zoltán Krasznai, Gábor Szabó  
Complete reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by simultaneous treatment with UIC2 monoclonal antibody and low doses of cyclosporine A  
3<sup>rd</sup> FEBS Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck, Austria, 27 February – 5 March, 2010

## **13 TÁRGYSZAVAK**

Immunológiai szinapszis, Kv1.3 csatorna, TASK csatorna, foszforiláció, protein kináz, regulátor T sejt, autoimmunitás, sejt kapacitás, csatornasűrűség

### **KEYWORDS**

Immunological synapse, Kv1.3 channels, TASK channels, phosphorylation, protein kinase, regulatory T cell, autoimmunity, cell capacitance, channel density

## 14 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Krasznai Zoltán egyetemi docensnek és Prof. Dr. Panyi György egyetemi tanárnak, akik mindig maximálisan támogattak, nagy szakmai tudásukkal és tapasztalatukkal irányították munkámat, biztosították szakmai fejlődésemet.

Köszönetem fejezem ki Prof. Dr. Szöllősi János egyetemi tanárnak a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi, valamint Prof. Dr. Gáspár Rezső egyetemi tanárnak a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet korábbi igazgatójának, hogy lehetővé tették számomra, hogy munkámat az Intézetben végezhessem.

Külön köszönettel tartozom Dr. Hajdú Péternek, akivel számos munkában együtt vettünk részt, hogy mindig maximálisan segített, és sok praktikus tanáccsal látott el.

Köszönetet mondok az elektrofiziológiai laboratóriumban dolgozó kollégáimnak, barátaimnak, Dr. Varga Zoltánnak, Dr. Papp Ferencnek, Dr. Szántó G. Tibornak, Szilágyi Orsolyának, Bartók Ádámnak, Domján Brigittának, akikhez bármikor fordulhattam segítségért, és akik a munkához mindig kellemes, légkört teremtettek.

Köszönettel tartozom Dr. Fábíán Ákosnak áramlási citometriás méréseiért.

Köszönet mondok Nagy Cecéliának a mérések előkészítésében nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok a 2.041-es számú Ph.D. szobában dolgozó társaimnak a baráti hangulatért, amivel hozzájárultak munkám hatékonyságához.

Szeretnék köszönetet mondani a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik e disszertáció elkészülésében segítségemre voltak.

Végezetül köszönöm Dr. Karácsonyi Botondnak és Családomnak türelmüket, biztatásukat és szerető támogatásukat.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. projekt nyújtott támogatást. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



## **15 FÜGGELÉK**

A megjelent közlemények gyűjteménye