

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**FESZÜLTSGFÜGGŐ IONCSATORNÁK
ELEKTROFIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATA**

SZÉKELY ANDREA



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET**

2007

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	6
2. CÉLKITŰZÉSEK	10
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
3.1. A K^+ csatornák szerepe a jelátvitelben és a limfocita-proliferációban.....	12
3.2. A $K_v1.3$ csatornák felépítése és működése	14
3.3. Csatornanyitás, inaktiváció	17
3.4. A K^+ csatornák gátlószerei	21
3.5. A membránok szerkezete, membránfluiditás	22
3.6. A koleszterin hatása a membránfluiditásra és egyes sejtfunkciókra	24
3.7. Zsírsavak hatása a sejtfunkciókra	25
3.8. Zsírsavak hatása ioncsatornákra.....	26
3.9. A jelátviteli folyamatokról	28
3.10. Az adenosin szerepe a szervezetben	29
3.11. A purinerg receptorok osztályozása	31
3.12. Adenosin-angonisták és –antagonisták	32
3.13. Az ioncsatornák kölcsönhatása az adenosinnal és a purinerg receptorokkal. A <i>DDT₁ MF-2</i> sejtek mint farmakológiai tanulmányok alanyai.....	34
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	37
4.1. Reagensok	37
4.2. A zsírsavak kötése az FBS-hez.....	37
4.3. A sejtek kinyerése és tenyésztése	37
4.4. A zsírsavösszetétel vizsgálata	38
4.5. Az ionáramok mérése.....	39
4.6. Az adatok kiértékelése	40
4.7. Statisztikai analízis	41
5. EREDMÉNYEK	43
5.1. A citoplazma-membrán foszfolipid-összetételének hatása a $K_v1.3$ csatornák funkciójára humán limfocitákban	43
5.1.1. A zsírsavak beépülésének ellenőrzése	43
5.1.2. A PUFA-k módosítják a $K_v1.3$ csatornák aktivációs és inaktivációs	

kinetikáját	43
5.1.3. Zsírsavas kezelés nem változtatja meg a $K_{v1.3}$ csatornák aktivációjának és inaktivációjának egyensúlyi paramétereit.....	47
5.2. Adenozin-analógok dóziszfüggően módosítják a DDT_1 MF-2 simaizom-sejtek K^+ csatornáinak működését.....	51
5.2.1. A DDT_1 MF-2 sejteken található ionáramok azonosítása	51
5.2.2. Adenozin-agonisták és -antagonisták módosítják a DDT_1 MF-2 sejteken mérhető K^+ áramokat	53
5.2.3. Adenozinreceptor-aktiváció vagy –inaktiváció nem befolyásolja a Na^+ áramokat a DDT_1 MF-2 sejteken	60
6. DISZKUSSZIÓ	64
6.1. A citoplazma-membrán foszfolipid-összetételének hatása az ioncsatornák és a transzporter membránfehérjék funkciójára humán limfocitákban.....	64
6.2. Adenozin-analógok hatása a DDT_1 MF-2 simaizom-sejtek K^+ csatornáinak működésére.....	70
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	73
8. SUMMARY	75
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	77
10. KÖZLEMÉNYEK.....	99
10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	99
10.2. Egyéb közlemények	99
10.3. Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek, megjelent absztraktok, előadáskivonatok.....	99
10.4. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások.....	101
10.5. Egyéb poszter.....	101
10.6. Egyéb előadások	102
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	103

RÖVIDÍTÉSEK

AA	arachidonsav
4-AP	4-amino-piridin
ADP	adenozin-difoszfát
AMP	adenozin-monofoszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
AZF	mellékvese <i>zona fasciculata</i> sejt
BK _{Ca}	Ca ²⁺ aktivált K ⁺ csatorna
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
ChTx	Charybdotoxin
Con A	concanavalin A
CPA	N ⁶ -ciklopentil-adenozin
CGS 21680	2-[p-(2-karbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etil-karboxamido-adenozin
CPX	1,3-dipropil-8-ciklopentil-xantin
CSC	8-(3-klórsztiril)-koffein
CTL	citotoxikus T sejt
DHA	dokozahexaénsav
DAG	diacil-glicerín
DGLA	dihomo- γ -linolénsav
DRM	detergens-rezisztens membrándomén
EPA	eikozapentaénsav
FA	zsírsav
FBS	foetal bovine serum
F-NECA	5'-N-(2-fluor-etil)-karboxamido-adenozin
G _i	inhibitor G fehérje
G ₀	stimuláló, a foszfolipáz C-hez kapcsolódó G fehérje
G _q	enzimműködést befolyásoló G fehérje
G _s	serkentő G fehérje
HPL	humán perifériás limfocita
IL-2	interleukin-2
IP ₃	inozitol-triszfoszfát
IP ₃ R	IP ₃ receptor

K _{ACh}	acetilkolin-függő K ⁺ csatorna
K _{ATP}	ATP szenzitív K ⁺ csatorna
K _{Ca}	Ca ²⁺ aktivált K ⁺ csatorna
K _V	feszültségkapuzott K ⁺ csatorna
LA	linolsav
Lck	Src típusú foszfortirozin-kináz
MÁH	megmaradó áramhányad
MgTx	Margatoxin
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MUFA	egyszeresen telítetlen zsírsav
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NECA	5'-N-etil-karboxamido-adenozin
NxTx	Noxiustoxin
OA	olajsav
PA	palmitinsav
PHA	phytohaemagglutinin A
PET	pozitron-emissziós tomográfia
PIP ₂	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PLC	foszfolipáz C
PLCγ	a foszfolipáz C γ alegysége
PK	protein-kináz
PKA	protein-kináz A
PKC	protein-kináz C
8-PT	8-fenil-teofillin
PTx	pertussis toxin
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav
P	purinerg
SA	sztearinsav
SFA	telített zsírsav
Src	szarkóma vírusból azonosított tirozin-kináz
TCR	T sejt-receptor
TEA ⁺	tetraetil-ammónium ion
UFA	telítetlen zsírsav
TREK-1	2 pórusú K ⁺ csatorna

TRAAK	arachidonsav-stimulált K ⁺ csatorna
TTx	tetrodotoxin
ZM 241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol

1. BEVEZETÉS

A humán limfociták K^+ csatornái fontos szerepet játszanak az immunválaszhoz szükséges jelátviteli folyamatokban [1-9], a sejtek membránjának hiperpolarizált állapotban történő fenntartásában és ezáltal a mitogén stimuláció elindításához szükséges feltételek biztosításában [10, 11]. A T sejtek specifikus antigének felismerését követően aktiválódnak, ami olyan biokémiai folyamatok kaszkádját foglalja magában, mely végül a T sejtek proliferációjához vezet. A T limfociták membránjában többféle K^+ csatornát azonosítottak, melyek közül a legjelentősebbnek a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák ($K_{Ca3.1}$ vagy IK_{Ca1}) és a feszültségfüggő, depolarizációra aktiválódó $K_v1.3$ csatornák bizonyultak [3, 12]. Ezek a csatornák közvetve szabályozzák az intracelluláris Ca^{2+} jeleket, amelyek nélkülözhetetlenek a T sejt-proliferációhoz. Valószínűsíthető, hogy a K^+ csatornák a membrán hiperpolarizációja révén teremtik meg a feltételeket a mitogén válaszhoz szükséges intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedéséhez [13-15].

A plazmamembrán lipidösszetétele számottevően befolyásolja a membránok tulajdonságait, például a fluiditást. A membrán dinamikai sajátosságai és folyadékkristályos állapota alapvetően befolyásolhat membránhoz kötött funkciókat, a membránfehérjék konformációját és flexibilitását, a permeabilitási viszonyokat, a citoplazma-membránban található ioncsatornák kinetikai paramétereit és az enzimaktivitásokat [16]. Ha a plazmamembrán lipidösszetétele és rendezettsége megváltozik, jelentősen módosulhatnak a membrán biofizikai paraméterei, és ez módosíthatja a membránfehérjék funkcióját [17-19]. Mivel az ioncsatornák transzmembrán fehérjék, a lipid-fehérje kölcsönhatások befolyásolhatják ezek működését is. A csatornák kapuzása fehérjekonformáció-változást jelent, ezért a csatornák lipidkörnyezetének megváltozása módosíthatja például azok aktivációs és inaktivációs kinetikáját [16, 20, 21].

A plazmamembrán koleszterin-tartalmának a membránfluiditásra, valamint a membránon keresztüli iontranszportra gyakorolt hatása régóta ismert [22]. A koleszterin a membrán mindkét lipidrétegében megtalálható, elsősorban annak dinamikai paramétereit módosítja. Az élettani értéktől eltérő koncentrációban gátolja a receptorfehérjék megfelelő működését; a membrán koleszterin-tartalmának növelése csökkenti, míg a koleszterin kivonása a membránból növeli az ioncsatornák aktivitását [21, 23, 24]. Ez azzal magyarázható, hogy a membrán koleszterin-koncentrációjának növekedésével a membrán

viszkozitása növekszik, s ez egyrészt mechanikai úton, másrészt a lipid-fehérje kölcsönhatások módosításával hat a csatornafehérje intramolekuláris mozgásaira.

Az utóbbi időben figyelemre méltó érdeklődésre tettek szert a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k), amelyeket mint természetes ágenseket az ártalmas gyulladásos válaszok és az autoimmunitás ellen használják. A legnagyobb érdeklődésre az n-3 PUFA-k tartanak számot. Számos tanulmány számol be az n-3 PUFA-k *in vivo* és *in vitro* gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatásáról [25-32]. Ezek a zsírsavak a szerzett és a természetes immunitás celluláris alkotóelemeit egyaránt befolyásolják. Feltételezések szerint a zsírsavaknak a sejtproliferációra kifejtett gátló hatása nem más metabolitokká történő átalakulás eredménye, hanem közvetlen hatás.

Az immunrendszer működését befolyásoló egyik közvetlen hatás az, hogy a PUFA-tartalmú triacil-glicerinek dózisfüggő módon elnyomják a concanavalin A (Con A)-stimulált limfocita-proliferációt patkányban, míg a telített zsírsavakat (SFA-kat) vagy olajsavat (OA) tartalmazó triacil-glicerinek nem gátolják az említett sejtválaszt [33]. A triacil-glicerinek limfocita-funkcióra kifejtett közvetlen hatásai megmagyarázhatják, hogy miért tapasztaltak javulást gyulladásos betegségekben szenvedő betegek állapotában PUFA-ban gazdag étrend következtében bizonyos klinikai vizsgálatok során.

A membránban található zsírsavak módosítása befolyásolja számos membránbeli enzim és ioncsatorna funkcióját, beleértve a K^+ csatornákat [pl. ATP szenzitív K^+ (K_{ATP}) csatorna, TREK-1 (2 pórúsú K^+ csatorna), TRAAK (arachidonsav-stimulált K^+ csatorna), Ca^{2+} aktivált K^+ (BK_{Ca}) csatorna, ATP aktivált K_1 háttércsatorna és foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP_2) aktivált K_{ATP} csatorna] is [21, 34-38, 214]. A csatornák funkciójának zsírsavakkal vagy más töltött lipidekkel történő módosítása valószínűleg azoknak közvetlenül magával a csatornafehérjével vagy néhány más csatorna-asszociált komponenssel kialakított kölcsönhatása révén valósul meg.

A táplálékkal felvett zsírsavak bekerülnek a vérkeringésbe, ahol a keringő limfociták fel tudják venni őket. Ha beépülnek a limfocitamembránba, megváltoztathatják a membrán kettős réteg szerkezetét és fluiditását, és – következésképpen – a membránfehérjék, így az ioncsatornák funkcióját. A perifériás limfociták ioncsatornái funkciójának megváltozása magával vonhatja a sejtes immunválasz megváltozását. Mivel a táplálékkal elfogyasztott zsírsavak beépülhetnek a sejtmembránba, az étrendnek fontos szerepe lehet a megfelelő membrán-lipidösszetétel kialakításában.

A sejtek közötti kommunikációt különböző extracelluláris szignálmolekulák (pl.

neurotranszmitterek, hormonok, növekedési faktorok) közvetítik. Ezek a molekulák külső kémiai ingerként viselkednek a jelátviteli folyamatok során, és az intracelluláris térben bekövetkező anyagcsere-változások indukálása révén valamilyen sejtválaszt váltanak ki. A hírvivő molekulák általában receptorokhoz specifikusan kötődnek, ily módon azoknak természetes ligandumai. A receptorok hatását sok esetben G fehérjék közvetítik, amelyek a sejtmembrán belső rétegében helyezkednek el, és összeköttetést jelentenek a receptorok és azon enzimek között, amelyek a másodlagos hírvivők szintézisét katalizálják. A másodlagos hírvivők közé tartozó ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintjét meghatározó adenilát-cikláz enzimet a G_s (serkentő) fehérje stimulálja, míg a G_i (inhibitor) fehérje gátolja [39, 40].

Az adenzin a sejtfunkciók endogén modulátora a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben. Szinte valamennyi sejtől felszabadulhat, megnövekedett oxigénszükséglet/oxigénellátás arány esetén kerül az extracelluláris térbe [41]. Számos élettani hatása régóta ismert [42-53]. Az adenzin hatásainak legnagyobb része sejt felszíni receptorokkal való kölcsönhatásnak tulajdonítható, mely receptorok a purinerg (P) receptorok családjába tartoznak. Számos megfigyelés történt arra vonatkozóan, hogy különböző gyógyszerek hatásmechanizmusa során purinergreceptor-aktiváció-változás következik be. A központi idegrendszerben található nagyszámú purinerg receptor megváltozott működésével számos idegrendszeri kórkép hozható összefüggésbe.

A purinerg receptorok endogén ligandumai az adenzin, az AMP, az ADP és az ATP. A purinerg receptorokat Burnstock javaslata alapján adenzinra (adenin-nukleozidra) érzékeny P_1 és ATP-re (adenin-nukleotidra) szelektív P_2 típusokra különíthetjük el [54]. Így a P_1 receptorok azonosak az adenzin-receptorokkal. A P_1 receptorok további A_1 , A_{2a} , A_{2b} és A_3 alosztályokra oszthatók [55]. Az e receptor-altípusok hatásai közötti kölcsönhatás komplex szabályozó mechanizmusra enged következtetni.

A szöveti adenzin-receptorok tipizálása specifikus adenzin-analógokkal (agonistákkal) vagy szelektív adenzinreceptor-antagonistákkal történhet. Ezek a természetes ligandumok szerkezeti analógjai, előbbiek a ligandumokhoz hasonló hatásúak, utóbbiak pedig nem idéznek elő biológiai választ, de képesek gátolni a ligandumok és az agonisták hatását. Az adenzin-agonisták valamennyien adenzin-származékok, az antagonisták lehetnek xantin- (pl. koffein-) vagy nem xantin-származékok.

Az adenzin-receptorok az egész szervezetben megtalálhatók. A nagy receptor-specifitással rendelkező agonisták és antagonisták pozitront emittáló atommal jelzett formái jól használhatóak az egyes adenzinreceptor-típusok szervezeten belüli eloszlásának feltérképezésére, a ligandumkötődés kinetikai sajátosságainak vizsgálatára [58-60].

Bár az adenosin-receptorok legismertebb jelátviteli útvonala az adenilát-cikláz aktivitásának gátlása vagy aktivációja, az adenosin sok hatása együtt jár a sejtmembrán vezetőképességének megváltozásával, különösen a K^+ és/vagy Ca^{2+} csatornák konduktanciájának módosulásával, s így – természetesen – membránpotenciál-változással is [61-65]. Ismert, hogy a membránpotenciál alapvető szerepet játszik a jelátvitelben, ezért indokolt lehet a membránpotenciál megváltozásának a sejtek adenosin-receptor-aktivációra történő válaszában kifejtett lehetséges szerepének tanulmányozása.

Kimutatták, hogy A_1 és A_2 adenosin-receptorok egyszerre vannak jelen bizonyos simaizom-sejteken. Ilyenek például a koszorúér-artéria simaizom-sejtjei valamint az általunk vizsgált, szíriai aranyhörcsög *vas deferenséből* izolált DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek, melyekben meglehetősen érzékeny adenilát-cikláz rendszer is található [66-69]. Így az utóbbiak tanulmányozásának kardiológiai vonatkozásai lehetnek. Simaizom-sejteken többfajta ioncsatornát azonosítottak: Ca^{2+} függő K^+ csatornát, feszültségfüggő K^+ csatornát és 'M' K^+ csatornát, valamint gyors befelé irányuló Na^+ csatornát és Cl^- csatornákat [70, 71]. Patch-clamp vizsgálatokkal igazolták, hogy a DDT₁ MF-2 sejtvonalon feszültségfüggő lassú, kifelé egyenirányító K^+ csatornák, Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák és gyors, befelé egyenirányító Na^+ csatornák vannak jelen [70].

Bizonyos sejtekben összefüggés mutatható ki a purinerg receptorok aktivációja és a sejtmembrán K^+ vezetőképessége között. *Xenopus laevis* ovulált petesejtjeiben például a P_1 receptor adenosinnal történő ingerlése kifelé irányuló K^+ áramot aktivál [72]. Mivel a cAMP stabil analógjai K^+ áramot váltanak ki, így feltételezhető, hogy az adenosin-receptorok stimulálják az adenilát-cikláz rendszert, és a K^+ áramot a cAMP-szint változásai módosítják.

A P_1 receptorok mellett K^+ csatornák jelenlétét is kimutatták a DDT₁ MF-2 sejteken, így itt is feltehető a P_1 mediált K^+ csatorna-aktiváció. Ily módon lehetőség nyílt ezen sejtek farmakológiai felhasználására: az A_1 és A_{2a} receptor-mediált mechanizmusok ugyanazon sejtvonalon történő tanulmányozására.

Xenopus oocitákban mesterségesen expresszáltatott, nyúlgyban és -májban kifejeződő [73] *Shaker* K^+ csatorna ($rabK_v1.3$) glibenclamid-érzékenységéről számoltak be [74]. Így indokolt lehet a DDT₁ MF-2 sejteken mérhető feszültségfüggő K^+ áram glibenclamid-szenzitivitásának tanulmányozása is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Feltételezésünk szerint – melyet irodalmi adatok is alátámasztanak – a citoplazma-membrán foszfolipidjeinek molekuláris összetétele módosítja a transzmembrán fehérjék (ioncsatornák és transzporterek) működését. A perifériás vérben lévő limfociták ioncsatornáinak funkcióinak megváltozása magával vonhatja a celluláris immunválasz megváltozását is.

Az előbbiek alapján kísérleteinkben arra a kérdésre kívántunk választ kapni, hogy a limfociták sejtmembránjába beépült különböző lánchosszúságú és telítettségű zsírsavak hogyan és milyen mértékben módosítják a limfociták $K_v1.3$ csatornáinak működését, s ezen keresztül a sejtek válaszkészségét. Megvizsgáltuk a palmitinsav (PA), a sztearinsav (SA), az OA, a linolsav (LA), az arachidonsav (AA) és a dokozahexaénsav (DHA) $K_v1.3$ csatornák kinetikai és egyensúlyi paramétereire kifejtett hatását.

2. A DDT_1 MF-2 sejtek A_1 és A_2 típusú receptorokat egyaránt expresszálnak, és feszültségfüggő K^+ és Na^+ csatornák is találhatóak a sejtmembránjukban. Mivel a cAMP stabil analógjai K^+ áramot válthatnak ki bizonyos sejteken, feltételezhető, hogy az adenosin-receptorok stimulálják az adenilát-cikláz rendszert, és a K^+ áramot a cAMP-szint változásai módosítják. Ennek alapján feltételezzük egy ilyen P_1 receptor-mediált K^+ csatorna-aktiváció jelenlétét a DDT_1 MF-2 sejteken. Feltételezésünk beigazolódása esetén ezek a sejtek ideális modellrendszert alkothatnának a feszültségfüggő ioncsatornák P_1 receptorok általi szabályozásának egyazon sejtvonalon történő tanulmányozására.

Ezért meg kívántuk vizsgálni, hogy egyes adenosin-agonisták (5'-N-etil-karboxamido-adenozin, NECA) és -antagonisták {4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol, ZM 241385} a P_1 receptorokkal történő kölcsönhatásuk révén hogyan módosítják a DDT_1 MF-2 sejteken mérhető feszültségfüggő áramokat.

Mivel irodalmi adatok utaltak arra, hogy a K_{ATP} csatorna-blokkoló 1-{4-[2-(5-klór-2-metoxibenzamido)etil]-fenilszulfonil}-3-ciklohexil-karbamid (glibenclamid, Gilemal) befolyásolja bizonyos feszültségfüggő csatornák konduktanciáját, ezért megvizsgáltuk, hogy a glibenclamid befolyásolja-e az általunk tanulmányozott feszültségfüggő áramokat.

Ezen felül össze kívántuk hasonlítani az 5'-N-(2-fluor-etil)-karboxamido-adenozin (F-NECA) és a NECA által a sejtmembrán K^+ konduktanciájára gyakorolt – adenozin A_1 és A_2 receptorok által közvetített – hatást a DDT₁ MF-2 sejteken, hogy ezáltal az említett agonista pozitron-emissziós tomográfiás (PET) diagnosztikában történő alkalmazhatóságáról információkat nyerjünk.

3. IRODALMI HÁTTÉR

3.1. A K^+ csatornák szerepe a jelátvitelben és a limfocita-proliferációban

A K^+ csatornák szinte minden sejtben megtalálhatók, és számos sejtszintű folyamatban kulcsszerepet játszanak. Így például részt vesznek a sejtek térfogat-szabályozásában, proliferációjában, a szervezet immunválaszának létrehozásában, a nyugalmi membránpotenciál és az akciós potenciál kialakításában [75, 76]. Szerkezetüket és működésüket tekintve nagyon különbözőek lehetnek. Limfocitákban sokféle ioncsatornát (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) azonosítottak [77-83]. A feszültségkapuzott K^+ (K_V) csatornák a különféle hematopoietikus eredetű sejtekben expresszálódnak, pl. a T és B limfocitákban, makrofágokban és a természetes ölüsejtekben (NK) [84]. A humán perifériás limfociták (HPL) domináns, depolarizációra aktiválódó $K_V1.3$ csatornái az immunválaszhoz szükséges jelátviteli folyamatokban [1-9] és a sejtek membránpotenciáljának hiperpolarizált állapotban történő fenntartásában [10, 11] játszanak jelentős szerepet.

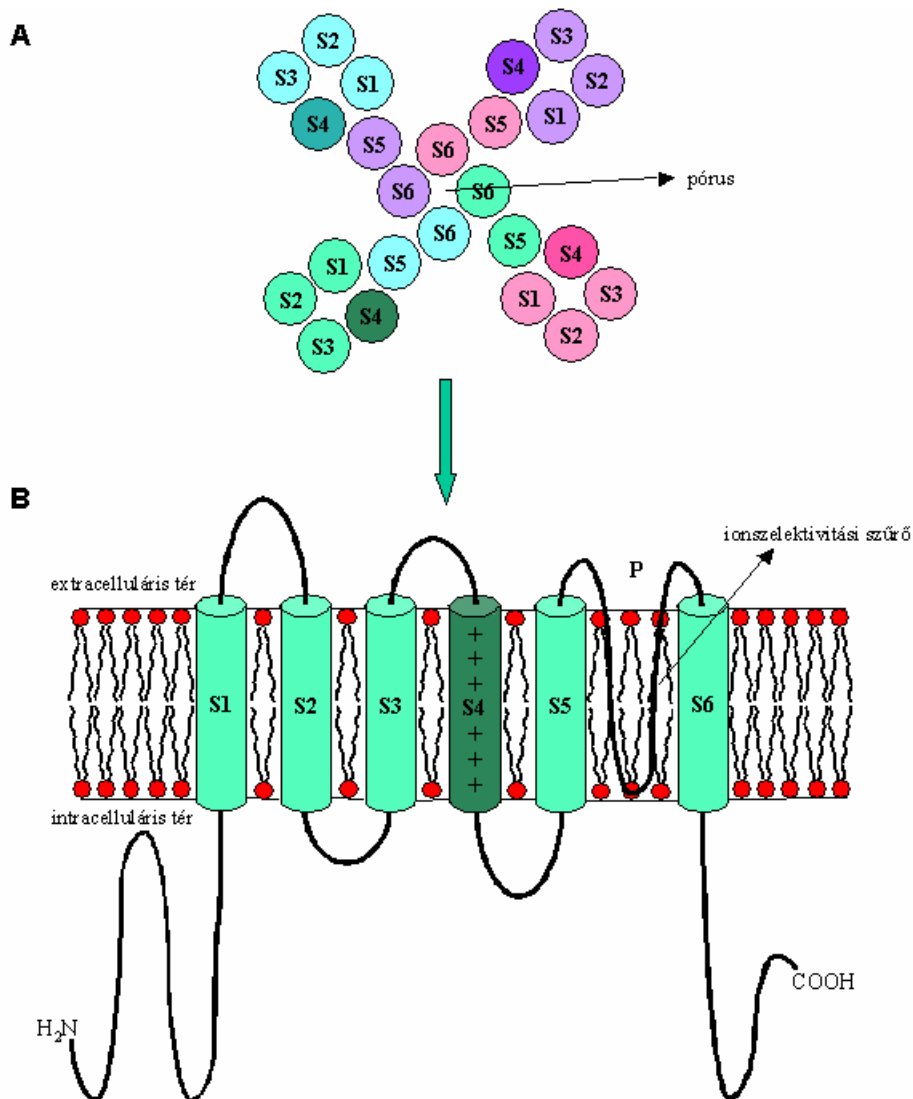
Az immunválasz feltétele a limfocita-aktiváció, mely magában foglalja a sejtek osztódását és differenciálódását. A folyamatban kulcsszerepet játszó humán limfociták egyrészt citokineket választanak ki, amelyek az immunválaszt kontrollálják, másrészt a direkt sejt–sejt kölcsönhatáson keresztül kommunikálnak. A limfocita-aktiváció első lépése a T sejt-receptor (TCR)–CD3 komplexnek az antigén-prezentáló sejt fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) fehérjéihez kötődő antigén általi aktiválása (2-3 óra), amit protein-kinázok (PK), pl. a protein-kináz C (PKC) és a foszfatidil-inozitol másodlagos hírvivő rendszer beindítása követ [85]. A folyamat eredménye inozitol-triszfoszfát (IP_3) felszabadulása, számos fehérje foszforilációja és az IP_3 -függő Ca^{2+} felszabadulás az endoplazmatikus retikulumból, valamint az intracelluláris raktárak kiürülését követő Ca^{2+} beáramlás az extracelluláris térből [6, 86], továbbá a membrán-transzportfolyamatok megváltozása miatt specifikus változások az intracelluláris ion- (Na^+ , H^+) [87] és metabolit-koncentrációk (glükóz, aminosavak) szintjén [88]. A limfocitákban a Ca^{2+} koncentráció növekedése lassú, több óráig tartó folyamat lehet – szemben az ideg- és az izomsejtek gyors Ca^{2+} tranzienseivel –, melynek eredményeképpen a sejtek proliferációját elindító gének [pl. az interleukin-2 (IL-2) autokrin növekedési faktor génje] átírása következik be [89] (1. ábra). Ez a Ca^{2+} szint-növekedés nagyon fontos a limfociták antigén-felismerési és válaszadó működésében. A Ca^{2+} jel függ a

létrehozott kation-kiáramlás hiperpolarizált állapotban tartja a sejtmembránt még a depolarizáló hatást jelentő Ca^{2+} influx mellett is, biztosítva ezzel a Ca^{2+} beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő Ca^{2+} mediált jelátvitelt.

A feszültségkapuzott K^+ csatornák blokkolói [tetraetil-ammónium-ion (TEA^+), *Charybdotoxin* (ChTx), *Noxiustoxin* (NxTx), *Margatoxin* (MgTx)] a K^+ áram gátlásán túl a sejtek mitogén-indukált proliferációját is hatékonyan gátolják [3, 90-94] – ez az egyik bizonyítéka a K^+ csatornák T sejt-aktivációban betöltött kulcsszerepének. Mivel a limfociták membránpotenciálját elsősorban a K^+ diffúziós potenciálja határozza meg, valószínűsíthető, hogy a K^+ csatorna-gátlószerek a membrán depolarizációja révén, a csökkent elektrokémiai hajtóerő miatt akadályozzák meg a mitogén válaszhoz szükséges intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésének létrejöttét [92, 95]. A nyugvó T sejt-membrán K^+ konduktanciájának növekedése mitogén stimuláció során, valamint a $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ csatornák expressziós szintjének növekedése a T sejt-aktiváció alatt szintén a K^+ csatornák T sejt-aktivációban és az azt követő proliferációban betöltött szerepét mutatja [12, 79].

3.2. A $\text{K}_V1.3$ csatornák felépítése és működése

A $\text{K}_V1.3$ a feszültségfüggő K^+ csatornák *Shaker* családjába tartozik [96]. A működőképes csatornát négy azonos alegység alkotja (homotetramer) [97], melyek mindegyike hat α -helikális transzmembrán szegmensből (TM) épül fel (S1-S6), az egyes szegmenseket intra- és extracelluláris hurkok kapcsolják össze (2. ábra). Újkeletű tanulmányok a K_V csatornák külső, lipid-oldali perifériájára helyezik az S1, S2 és S3 szegmenseket [98, 99]. Úgy gondolják, hogy mind az S4-et, mind az S6-ot körülveszi a csatorna maradék része, s az S4 és az S6 valahol a központi pórus és a csatorna lipidek felőli széle között helyezkedik el [99]. A feszültségkapuzott csatornák feszültség szenzor doménjeit (minden alegységben egyet, vagyis csatornánként négyet) az S1-S4 szegmensek alkotják, ezek felelősek a K_V csatornák feszültségfüggő aktivációjáért [100]. Az S3b és S4 hélixek evezőlapát-szerű motívumokat alkotnak a pórus körül, ezek a részek vezérelhetik a csatorna nyitását a membrán depolarizációja során [101]. A Tarantula-toxinok, amelyek beépülnek a membránokba, képesek kölcsönhatni ezekkel az „evezőlapát” motívumokkal a lipid-fehérje határfelületen és megzavarni a feszültségfüggő aktivációt. Az S5 és S6 szegmensek és a hozzájuk kapcsolódó extracelluláris hurok (P) (a négy alegység ezen szakaszai együtt) alkotják a belső pórusképző komplexet, amelyen keresztül a K^+ ionok átjutnak a membránon [102-106], valamint az aktivációs kaput a csatorna citoszolikus oldalán, ami megakadályozza



2. ábra. A K_V csatornák sematikus szerkezete

A) A homotetramer molekula az extracelluláris oldal felől. Az S5 és S6 szegmensek találhatók a csatorna pórusában, a többi szegmens a csatorna külső részén helyezkedik el, evezőlápat-szerűen körülvéve a pórusdomént. A belső hélixek csokorszerűen megcsavarodnak („bundle crossing”). Az S1–S4 hélixek által alkotott feszültségérzékelő domének érzékelik a membránban bekövetkező potenciál-változást, ennek következtében lejátszódó elmozdulásuk pedig a csatornafehérje konformációjának olyan megváltozásához vezet, ami a csatorna nyitását eredményezi. Minden alegységet különböző színnel jelöltünk. **B)** A csatorna egy alegysége. Minden egyes alegység hat transzmembrán α -hélixből és az azokat összekötő intra- és extracelluláris hurkokból áll. Az S1 szegmens intracelluláris végéhez kapcsolódik az N-típusú inaktivációért is felelős N-terminális vég (a „lánc” és a „labda”), az S6 szegmenshez kapcsolódik a C-terminális vég, ugyancsak intracelluláris oldalon.

az ionok áramlását a csatorna zárt állapotában [107]. A csatorna ugyanezen régiója felelős számos peptid- és kismolekula-gátlószer kötéséért is. A pórusrégió tartalmazza a K⁺ szelektivitást biztosító, négy aminosavat tartalmazó szekvenciát is [108].

A belső (S6) hélixek virágcsokor szálaihoz hasonlóan egymást keresztezve („bundle crossing”) alakítják ki a csatorna aktivációs kapuját a csatorna citoszolikus bejáratánál [109]. Eukarióta K_V csatornában itt található a Pro-X-Pro triplett szekvencia (ahol X egyéb aminosav), mely nagyon fontos a kapuzás során [110, 111]. Ez a szekvencia hiányzik a prokarióta *Shaker* K_V csatornában. Az S6 hélixek az aktivációs kaputól extracelluláris irányba haladva egymástól távolodnak, helyet adva az extracelluláris oldalhoz közel a szelektivitási filternek [108].

Kiderült, hogy a transzmembrán hélixek mellett a csatornák citoszolikus N-terminusa is struktúrált, az N terminus egy tetramerizációs (T1) domént képez [112-115]. A négy alegység összesen négy T1 doménje együttesen tetramert képez az intracelluláris membránfelszínen. Ez a domén közvetlenül a pórus citoplazma felőli bejáratánál található, azaz a transzmembrán pórusnak a T1 domén oldalsó portáljain keresztül kell kommunikálnia a citoplazmával ahhoz, hogy a K^+ át tudjon jutni a póruson [116-118], ill. hogy a pórusba be tudjon kötődni a gyors, N-típusú inaktivációért felelős „inaktivációs labda” [119, 120]. Az eukarióta K_V csatornák legtöbbször a T1 doménhez β alegység kapcsolódik [121, 122], mely alegység NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)-függő aldo-keto reduktáz enzimekkel kapcsolatban álló, tetramert képező fehérje [123].

Bár a feszültség-szenzor és a pórusdomén izoláltan jól jellemzett, a csatolás a két domén között nem világos. Úgy tűnik, hogy a feszültség-szenzorok alapvetően független domének a membránon belül: izolált doménként expresszálhatók [124] vagy átvihetők nem-feszültségvezérelt ioncsatornába, mely csatornák így feszültség-érzékenyvé tehetők [111, 125]. Röntgen-szerkezeti vizsgálatok alátámasztották, hogy a feszültség-érzékelő domének és a pórusdomén közötti határfelület nem rendelkezik kiterjedt fehérje-fehérje kapcsolattal, hanem a feszültség-szenzor domének bolyaszerűen lebegnek a membránban [126]. A feszültség-érzékelő domének és a pórusdomén közötti kölcsönhatás rendkívül fontos az összehangolt működéshez, amely a csatornanyitást eredményezi. A feszültség-szenzorok mechanikailag hathatnak a pórusra az S4-et és S5-öt összekötő hélixeken keresztül, melyek olyan helyzetűek, hogy összehúzzák vagy kitágítják az S6 belső hélixeket a pórusban [127].

Prokarióta K_VAP csatornák szerkezetvizsgálata során bebizonyosodott, hogy a lipidmembrán sértetlensége szükséges a feszültség-szenzor pórushoz viszonyított megfelelő orientációjának kialakulásához [124]. A lipidek módosítása a külső membránrétegben erős hatást gyakorol a feszültség-szenzor-aktivációra [128], ami valószínűsíti, hogy a lipidek viszonylag specifikus módon hatnak kölcsön a K_V csatornák kapuzásban részt vevő régióival. A membránösszetételben bekövetkező változások a membránalkotókkal érintkező

szegmensekben okozhatnak változás(oka)t, ami természetesen – közvetve – az egész csatorna szerkezetére és működésére kihat.

3.3. Csatornanyitás, inaktiváció

A feszültségkapuzott K^+ csatornáknak a membrán depolarizációja által kiváltott aktivációját (nyitását) a csatornafehérje első négy szegmensében bekövetkező konformációs változásnak tulajdonítják, melynek során a feszültség-szenzor domén elmozdul az extracelluláris tér irányába, és a csatorna citoszolikus bejáratánál lévő aktivációs kapu kinyílását eredményezi [129-132]. A csatornanyitás a négy alegység kooperatív mechanizmusa révén jön létre [133]. Úgy gondolják, hogy a K_V csatornák kapuzási mechanizmusa a négy feszültség-érzékelő doménnek a nyugalmi és az aktivált állapot közötti több viszonylag független elmozdulását foglalja magában, amit egy összehangolt nyitási átmenet követ, ahol az S6 kapu zártból (C) nyitott (O) állapotba mozdul. Ennek megfelelően egyetlen nyitott és több zárt állapotot tartalmazó lineáris kinetikai modellt javasolnak a csatornkapuzásra (néhány csatorna rendelkezhet két vagy több nyitott állapottal is), pl.: $C_4 \leftrightarrow C_3 \leftrightarrow C_2 \leftrightarrow C_1 \leftrightarrow O \leftrightarrow I$. A kapuzás a csatornafehérjében a zárt állapotok között bekövetkező konformációs változások sorozata, azaz „kapuzó részek” mozgásának egymásutánja – a zárt csatornában megy végbe, és az utolsó „kapuzó rész” elmozdulása a csatorna nyitása [134a]. A Shaker K^+ csatornákra Zagotta, Hoshi és Aldrich legalább nyolc lépést javasolt a csatorna aktiválásához szükséges töltés szállítására [135].

A K_V csatornák kapuzása a feszültség-szenzor két jól megkülönböztethető elmozdulását foglalja magában. Az első mozgás eredményezi a kapuzó töltés nagy részének elmozdulását, és megfelel a négy feszültség-szenzor nyugalmi és aktivált állapotok közötti mozgásának [133, 136, 137, 139-148]. Ez a korai elmozdulás viszonylag függetlenül jelenik meg a négy alegységben [143, 144, 147, 149-151], és detektálható változást eredményez az S6 kapu közelében, de ténylegesen nem nyitja ki a kaput [139, 152]. A feszültség-érzékelő és a pórusdomének közötti merev, szoros kapcsolat hiánya következtében a feszültség-szenzornak ez az első mozgása nem okoz kiterjedt szerkezeti változást a pórusdoménben [109, 124, 140, 153]. A feszültség-szenzor második elmozdulása az összehangolt nyitási átmenet során a kapuzási töltés kis részének elmozdulását foglalja magában [139, 143-145, 147, 151, 152]. A $K_V1.2$ kristályszerkezete szoros kölcsönhatást mutat az S4-et és az S5-öt összekötő szakasz és az S6 között [109, 124]. Feltételezhető, hogy az S4–S5 összekötő és az S6 közötti kölcsönhatás játssza a fő szerepet abban, hogy az aktivációs kapu képes követni az S4

mozgásokat, és hogy az S4 és S5 alegységek közötti kölcsönhatás specifikusabb szerepet biztosít a második S4 mozgás végső nyitási átmenetben történő részvételében [140].

A konformáció-változás sebességi állandója erős feszültségfüggést mutat. A $K_v1.3$ csatornák aktivációs küszöbfeszültsége -50 mV körül van, ami megegyezik a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljával. Az aktivációs küszöb felett a nyitási valószínűség meredeken emelkedik a membrán depolarizációjával [154]. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése a szigmoid futású Boltzmann-függvénnyel jellemezhető, és $+20 - +30$ mV körül éri el a telítési értéket, amikor is a csatornák nyitási valószínűsége 1.

A gyors aktivációt követően, depolarizált membrán mellett a *Shaker* K^+ csatornák egy nem vezető, inaktivált állapotba kerülnek, mert a nyitott állapot nem stabil konformáció. Az inaktiváció szintén konformáció-változás, és az inaktiválódó K^+ csatornában a kapuzó töltés mozgásának lassulása ill. „befagyasztása” következik be [155, 156]. Az inaktivált állapot egy stabil, nem-vezető állapot. A csatornatípusra jellemző időnek el kell telnie a membrán repolarizációja után ahhoz, hogy a csatorna visszatérjen nyugalmi állapotba és ismét képes legyen kinyitni. Az inaktiváció kialakulása jellemző időfüggést mutat annak megfelelően, hogy milyen mechanizmussal játszódik le az inaktiváció. A csatornák teljesen csak akkor tudnak bezáródni, ha az inaktiváció már lezajlott, és így a rögzített kapuzó töltés újra mozgékonyá válik [134b].

Az inaktiváció kétféle mechanizmus révén valósulhat meg. Az N-típusúnak nevezett gyors inaktiváció néhány ms alatt jön létre, és az ún. „labda-és-lánc” („ball-and-chain”) mechanizmus következtében alakul ki, amelyben a fehérje intracelluláris N-terminusa blokkolóként viselkedik úgy, hogy a csatorna citoplazma felőli oldalán bekötődik, ezáltal elzárja a pórust [157]. Az inaktivációs domén (peptid) nem specifikus: az alapvető kritérium vele szemben, hogy kb. 10 hidrofób aminosavat tartalmazzon, mely szakaszt nettó pozitív töltésű aminosavaknak kell követniük. Az inaktivációs domén hidrofób részei közvetlenül a csatorna hidrofób régióival hatnak kölcsön, míg a töltött részek közötti nagy kiterjedésű elektrosztatikus kölcsönhatások hatékonyan elősegíthetik az inaktivációs doménnek a kötőhelyre történő belépését [158, 159]. Feltehetőleg az N-terminális bázikus részei és a T1–S1 összekötő savas részei közötti kölcsönhatások stabilizálják az inaktivációs domén kötődését [160]. A tetramer K^+ csatorna inaktivációs doménjei egymástól viszonylag függetlenül működnek, bár néhányan az inaktivációs domének közötti kismértékű negatív kooperációról számoltak be [161]. Egyetlen alegység inaktív állapotba kerülése elegendő a csatorna inaktivációjához [162, 163]. Számos *Shaker* K^+ csatornában, köztük a $K_v1.3$ -ban is hiányzik ez az inaktivációs egység (a „labda”).

Ez a folyamat csak az intracellulárisan alkalmazott csatornablokkolókra érzékeny, mint pl. a TEA^+ , érzéketlen viszont az extracelluláris K^+ -ra vagy TEA^+ -ra. Az intracellulárisan alkalmazott TEA^+ lassítja az inaktivációs folyamatot, minthogy verseng a kötőhelyért az inaktivációs egységgel [164]. Mind az N-típusú inaktiváció, mind az intracellulárisan alkalmazott kvaterner ammónium-ionokkal történő gátlás szignifikánsan lassítja a kapuzási töltés visszatérését repolarizáció során; ezt töltésbefagyasztásnak nevezzük [165]. A belső üreg kitöltése a gátló ionnal vagy az inaktivációs doménnel akadályozza az aktivációs kapu bezáródását, és így késlelteti a feszültségérzékelő elemek visszatérését nyugalmi konformációjukba [166].

Az N-típusú inaktiváció membrán-foszfolipidek általi módosításáról is beszámoltak. A plazmamembrán anionos foszfolipidekkel (pl. PIP_2 -vel) történő dúsítása gátolhatja az N-típusú inaktivációt $\text{K}_v1.4$ csatornában vagy $\text{K}_v\beta$ alegységgel expresszáltatott $\text{K}_v1.1$ csatornában [167]. A PIP_2 fiziológiás koncentráció-tartományban gátolja ezt a folyamatot. A gátlás mechanizmusa sokkal inkább függ az N-terminális inaktivációs domén semlegesítésétől/lekötésétől, semmint a kötőhely lezárásától.

Az N-típusú inaktivációtól lényeges különböző sebességgel és mechanizmussal lejárászó C-típusúnak nevezett lassú inaktiváció néhány 100 ms – több s alatt következik be, sebessége függ a C-terminus aminosav-összetételétől. Ez az inaktiváció egyértelműen megkülönböztethető az N-típusú inaktivációtól, mert nem szűnik meg az N-terminális eltávolításával, továbbá intracelluláris TEA^+ sem gátolja [164]. A C-típusú inaktiváció elsődlegesen a szelektivitási filter és a csatorna extracelluláris bejárata környékén összetett mechanizmussal lejárászó konformáció-változás eredménye. Fontos különbség az N- és a C-típusú inaktiváció között a sztöchiometria is. Míg az N-típusú inaktiváció során az inaktivációs domének alapvetően egymástól függetlenül mozognak, és az inaktiváció kialakulásához egyetlen alegység inaktivációs doménjének elmozdulása elegendő, addig a C-típusú inaktivációhoz a négy csatorna-alegység együttes mozgása szükséges, mind a négy alegység hozzájárul a C-típusú inaktivációs átmenet aktivációs energiájához [168, 169].

A feszültség-szenzor is bizonyíthatóan szerepet játszik a C-típusú inaktivációban: lehetséges, hogy a folyamat kiváltója, és valószínűleg valamilyen konformációs átrendeződésen is keresztül megy a C-típusú inaktivációval együtt [166, 170, 171] Loots és Isacoff (1998) [170] a feszültség-szenzor gyors, az inaktiváció kezdete utáni (de nem a csatorna nyitott állapotában bekövetkező) molekuláris mozgását mutatták ki. A változásnak két komponensét fedezték fel: egy gyors komponens a feszültség-szenzor gyors mozgásának tulajdonítható, egy lassú komponens pedig megfelel az inaktivációs sebességnek.

A C-típusú inaktiváció beállása kétségtelenül a kapuzási töltés mozgásának befagyasztását okozza [172-174]. A kapuzási töltés befagyasztását nagymértékben lassíthatják vagy gátolhatják permeáló kationok vagy a csatornablokkoló 4-AP (de kvaterner ammóniumionok nem) [174-176]. A permeáló ionok szelektivitási filteren belüli nagy affinitású megkötése képes stabilizálni a nyitott pórusszerkezetet és valahogy megakadályozni a töltésbefagyasztást, ami a C-típusú inaktivációt kíséri [174].

A C-típusú inaktiváció az externális kationokra és a csatornapórus aminosav-összetételére érzékeny. Ezt a folyamatot az extracelluláris K^+ koncentráció megemelkedése gátolja [178, 179]. A C-típusú inaktivációt a csatorna extracelluláris oldalán alkalmazott TEA^+ lassítja, ugyanakkor érzéketlen az internális TEA^+ -ra [164]. Azok a helyek, amelyeken a TEA^+ gátol, illetve verseng a C-típusú inaktivációval, elkülöníthetők. Az inaktiváció módosításához a TEA^+ -nak mélyen a csatorna szájadékaiba kell belépnie, a C-típusú inaktivációt pedig alapvetően a pórus adott helyére korlátozott konformációs változás idézi elő [180]. A C-típusú inaktivációt befolyásolja a csatorna extracelluláris szája közelében és valószínűleg a csatorna szelektivitási filterében található nagy K^+ szelektivitású kötőhely betöltöttsége [181]. Bizonyos permeábilis ionok, mint a K^+ vagy a Rb^+ elfoglalják ezt a helyet, és stabilizálják a nyitott állapotot, megakadályozva ezzel a C-típusú inaktivációt, ezzel ellenben a Na^+ ionoknak nincs ilyen hatásuk [181, 182]. Ezeket a megfigyeléseket az ún. „foot in the door” mechanizmussal magyarázzák, amikor is a csatorna extracelluláris oldalán található ionkötő hely K^+ -nal vagy TEA^+ -val történő kitöltése lassítja vagy megakadályozza a C-típusú inaktivációhoz szükséges konformáció-változásokat [183].

A lassú inaktiváció első fázisa a szelektivitási szűrőben bekövetkező konformációváltozást jelenti, ezért ezt a fázist P-típusú inaktivációnak nevezik. Manapság inkább a C-típusú inaktivációtól való megkülönböztetésre használják, figyelembe véve a kapuzási töltés befagyasztásának kiterjedtségét. A *Shaker* csatornák lassú inaktivációja ugyanis két egymás utáni folyamatot foglal magában: a csatornapórus kezdeti bezáródását, ami áramcsökkenést eredményez, és az azt követő sokkal lassabb konformációváltozást, ami stabilizálja a feszültségszenzort és a pórust, és töltésbefagyasztást eredményez [170]. Loots és Isacoff (1998) [170] 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. Sok esetben, ahol a pórus-inaktiváció és a töltésbefagyasztás relatív mértéke nem tisztázott, az összevont P/C-típusú inaktiváció megnevezést használják [166].

A K_V csatornában több inaktivációs mechanizmus is létezhet és kölcsönhatat egymással [166]. Az N- és C-típusú inaktivációval egyaránt rendelkező csatornában az inaktivációból való visszatérés időállandóját a C-típusú inaktiváció határozza meg, az N-típusú inaktivációs domén jelenléte nem befolyásolja az inaktivációból történő visszatérést [181, 184]. A *Shaker* csatornában az áram csökkenését az N- és a C-típusú mechanizmusok közötti kölcsönhatás okozza, és az N-típusú inaktiváció elősegíti és gyorsítja a C-típusú inaktivációs folyamat beindulását [181, 177]. Ugyanakkor allosztérikus kapcsolódás is felléphet az N-terminális inaktivációs domén vagy kvaterner ammóniumionok és a C-terminális inaktiváció között [175, 183-187]. Az N-terminális inaktivációs domén bekötődése rögzíti a feszültség-szenzorokat aktivált állapotukban, és így elősegíti a C-típusú inaktivációt [182]. A C-típusú inaktiváció kialakulásának nem feltétele az N-típusú inaktiváció. A $K_V1.3$ csatornák inaktivációját kizárólag a lassú, P/C-típusú mechanizmus [188].

Az inaktiváció alapján véve csökkenti a membránpotenciál-kontrollhoz rendelkezésre álló, aktiválható K^+ csatornák számát. A $K_V1.3$ csatornák C-típusú inaktivációja azonban sokkal lassabb, mint a rokon $K_V1.x$ csatornák inaktivációja, így az aktivált $K_V1.3$ csatornák jelentős K^+ fluxust képesek létrehozni, mielőtt a nem-vezető inaktív állapotba kerülnek. A $K_V1.3$ csatornák e tulajdonságai, valamint a limfociták membránjának rendkívül magas ellenállása (10–20 G Ω) biztosítják azt, hogy a T sejtek membránpotenciálját kevés számú ioncsatorna is képes fenntartani [189].

A $K_V1.3$ csatornák egyensúlyi inaktivációja nem teljes a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljánál [190]. Az egyensúlyi aktiváció és az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése egy olyan membránpotenciál-ablakot határoz meg, amelyen belül a $K_V1.3$ csatornák aktívak. Ez az ablak a limfociták nyugalmi membránpotenciál-értékének megfelelő feszültségeknél van, így a $K_V1.3$ csatornákon keresztüli K^+ fluxus hozzájárulhat a diffúziós membránpotenciál kialakításához [190, 191].

Ha a tartós depolarizáció után a sejteket hiperpolarizáljuk, az inaktivált állapotban levő csatornák visszatérnek zárt állapotba. A hiperpolarizáció fokozásával a visszatérés mértéke növekszik, a visszatérés kinetikája pedig gyorsul. Az inaktivációból történő visszatérést jelentősen befolyásolja az extracelluláris tér kation-összetétele is.

3.4. A K^+ csatornák gátlószerei

Az ioncsatorna-gátlószerek a sejtválaszok gátlásán túl – a csatornákhöz történő specifikus kötődésük miatt – a csatornaszerkezet-funkció kapcsolatának vizsgálatára is

alkalmasak. Kémiai szerkezetük alapján megkülönböztetünk peptid és nem-peptid típusú gátlószereket.

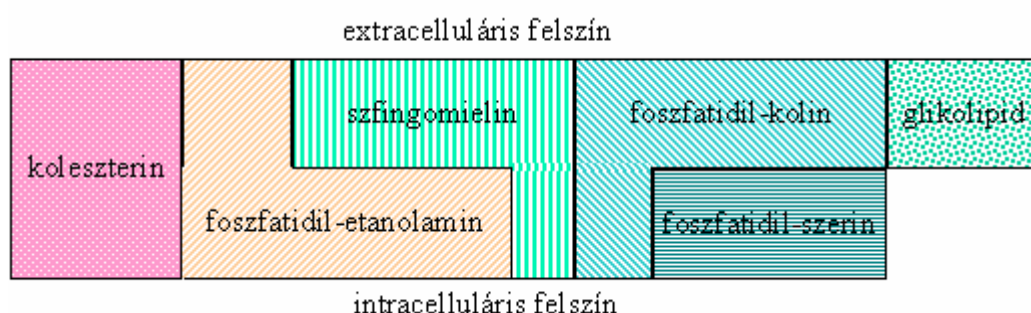
Az állati eredetű, többnyire skorpiók mérgéből származó peptid inhibitorok merev struktúrájú, kis molekulájú anyagok, melyek az ioncsatorna extracelluláris nyílásába kötődve pórusblokkolóként elzárják az áthaladás útját a K^+ ionok elől. Receptoruk legtöbbször az S5-S6 hélixek közötti hurok S5-höz közeli régiója, valamint a pórus szelektivitási filterében elhelyezkedő aminosav-oldalláncok. Igen kis, nano- vagy pikomoláris koncentrációban hatékonyak. A ChTx nagy affinitással blokkolja a humán limfociták feszültségfüggő és Ca^{2+} aktivált K^+ csatornáit [92, 192], a NxTx és a MgTx specifikusan a feszültség-vezérelt K^+ csatornákra hat [92, 193].

A nem-peptid gátlószerek szerkezetüket, kötődési mechanizmusukat, sztöchiometriájukat és kötőhelyeiket tekintve igen sokszínűek. A gátlószercsoport a kis-molekula inhibitor elnevezést kapta. Az egyik leggyakrabban használt nem-peptid inhibitor, a TEA^+ a csatorna nyitott pórusába kötődve zárja el a K^+ ionok útját; segítségével elkülöníthető a K^+ csatornák N- és C-típusú inaktivációja [164, 188]. A *Shaker* csatornák egy extra- és egy intracelluláris kötőhellyel is rendelkeznek a molekula számára, melyek csak a csatorna nyitott állapotában hozzáférhetők. Az extracelluláris kötőhelyhez kötődve a TEA^+ lassítja a C-típusú inaktivációt, mert a TEA^+ -t megkötött csatorna pórusa nem képes felvenni az inaktivált állapotot jellemző konformációt („foot-in-the-door” mechanizmus). Az intracelluláris kötőhelyhez történő kötődés során a TEA^+ az N-típusú inaktivációért felelős „labdával” verseng, ezáltal lassítja az inaktivációs kinetikát [194]. A 4-amino-piridin (4-AP) a nyitott és inaktivált csatornához az intracelluláris oldalon kötődik. Extracelluláris alkalmazása esetén nem-ionizált formában áthatol a membránon, majd ionizált formában belülről gátolja a K^+ áramot [195].

3.5. A membránok szerkezete, membránfluiditás

A sejtmembránok foszfolipid kettősrétegek, amelyek különféle fehérjéket, glikoproteineket, glikolipideket, szfingolipideket, glikoszfingolipideket, koleszterint stb. tartalmaznak [196]. Ezek a membránalkotók diffúzióra képesek, egymással is kölcsönhathatnak, és meghatározott doménszerkezetet mutatnak [197, 198]. A lipidösszetétel felelős a domének jelenléért a membránban, és a lipidképződés folyamatában a fő szerepet a koleszterin és a szfingolipidek játsszák [199]. A lipidek elrendeződése a membránokban aszimmetrikus: az egyes lipidtípusok nagyobb mennyiségben fordulnak elő a kettősréteg

külső vagy belső rétegében (3. ábra). Ez az aszimmetria statisztikus jellegű [200]. Nemrégiben lipid mikrodoméneket és raftokat, azaz a membránbeli fehérjék specifikus fajtáinak nem-véletlenszerű eloszlású mintázatait fedezték fel, amelyek kisméretű klasztereket képeznek molekuláris szinten, és nagyméretű klasztereket (klasztércsoportokat, szigeteket) alkotnak szubmikronos szinten a plazmamembránban [201-204]. Több K^+ csatornáról [205, 206], így a $K_v1.3$ -ról is kimutatták, hogy lipid raftokban lokalizálódnak a sejtmembránban [207].



3. ábra. A lipidek aszimmetriája a membránban [Somogyi J, 1989]

A kettősréteg külső részében található a foszfatidil-kolin és a szfingomielin döntő többsége, valamint az összes glikolipid, míg a belső rétegben a foszfatidil-etanolamin nagy része és a foszfatidil-szerin egésze. A koleszterin mindkét lipidrétegben megtalálható.

A plazmamembrán lipidösszetétele számottevően befolyásolja a membránok tulajdonságait, például a fluiditást. A membránok fluiditása vagy szerkezeti rendje alapvetően befolyásolja a membránhoz kötött folyamatokat és -funkciókat, a membránban kötött fehérjék működését [16]. A membrán dinamikai sajátosságai és folyadékkristályos állapota befolyásolhatja a membránban kötött fehérjék konformációját és flexibilitását, a permeabilitási folyamatokat, a citoplazma-membránban található ioncsatornák kinetikai paramétereit és az enzimaktivitásokat [17-19]. Különböző körülmények között a plazmamembrán lipidösszetétele és rendezettsége megváltozhat. Ez a változás szignifikánsan módosíthatja a membránfluiditást és a membrán egyéb biofizikai paramétereit (görbület, feszülés stb.), megváltoztatva ezzel az alapvető tulajdonságokat a membrán módosított részeiben, így azt a környezetet is, amelyben a fehérjék eloszlanak. A membránösszetételben bekövetkező változás hatással lehet bármely olyan folyamatra, amely függ a membránfunkciótól, és különösképpen az ioncsatornák működését zavarhatja meg [209, 210]. Egy 'optimális fluiditás' hipotézist javasolnak a membránfehérjék konformációs átmeneti

tulajdonságainak értelmezésére, mivel megfelelő membránfluiditás szükséges ahhoz, hogy lehetővé tegye pl. az acetilkolin-receptor alacsony és magas affinitású helyeinek egymásba alakulását [19].

Mivel az ioncsatornák transzmembrán fehérjék, a lipid-fehérje kölcsönhatások befolyásolhatják azok működését is. A csatornák kapuzása fehérjekonformáció-változást jelent, ezért a csatorna lipidkörnyezetének megváltozása módosíthatja például annak aktivációs és inaktivációs kinetikáját [16, 20, 21].

3.6. A koleszterin hatása a membránfluiditásra és egyes sejtfunkciókra

A membránok egyik meghatározó alkotóeleme, a koleszterin a kettősréteg külső felében található, és elsősorban annak dinamikai paramétereit módosítja. A biomembránok fluiditása csökken koleszterinnel történő dúsítás során.

A sejtmembrán koleszterin-tartalma számos membránfehérje működését befolyásolja, beleértve az ioncsatornákat, a transzportereket és a receptorokat. A koleszterin minden tanulmányozott membránbeli ATP-ázra gátló hatást fejt ki, míg a legtöbb más membránfehérjére stimuláló hatást gyakorol [22]. A T sejtekben lejátszódó jelátviteli útvonalak szabályozására kifejtett döntő szerepét is kimutatták [211]. T sejtekben a glikozil-foszfatidil-inozitolhoz (GPI) horgonyzott fehérjék általi jelátvitelt gátolja a sejt koleszterin-tartalmának csökkentése, akkor is, ha a sejtfelszíni GPI-horgonyzott fehérjék expressziója változatlan marad, ugyanakkor a CD3-on keresztüli stimuláció csak minimális mértékben változik [212].

A koleszterin módosítja a humán T limfociták K^+ csatornáinak kapuzását [21, 23, 24]. A sejtmembrán dúsítása a mikroviszkozitást növelő koleszterinnel lassítja a K^+ csatornák aktivációs és inaktivációs kinetikáját, az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése pedig a depolarizáció irányába tolódik, ugyanakkor az egyensúlyi inaktiváció nem változik szignifikánsan. A koleszterin kivonása pedig gyorsítja az inaktivációt anélkül, hogy az aktivációs kinetikát befolyásolná [21]. Meg kell azonban jegyezni, hogy a Hajdú és mts. [21] által elért koleszterin-kivonás nem változtatta meg jelentősen a membrán mikroviszkozitását.

A membrán koleszterin-tartalmának más ioncsatornákra kifejtett hatása is jól ismert. Az N-típusú Ca^{2+} csatorna-inaktiváció reverzibilisen a negatív potenciálok irányába tolódik szintetikus detergentek hatására, amelyek csökkentik a kettősréteg feszülését, míg a koleszterin, ami növeli a kettősréteg feszülését, pozitív potenciálok irányába tolja el a

csatorna-inaktivációt. A Ca^{2+} csatorna feszültség-aktivációját nem befolyásolják a feszülésben bekövetkező változások [209].

A magyarázat valószínűleg a szerkezetben, a konformációban és a térkitöltésben keresendő. A lipidek egyrészt mechanikai úton, másrészt a lipid-fehérje kölcsönhatások módosításával hatnak a csatornafehérje intramolekuláris mozgásaira.

Az előbbieket alapján feltételezhető, hogy a PUFA-k, amelyek a membrán fluiditását növelik (mikroviszkozitását csökkentik), gyorsítják az ioncsatornák kapuzási kinetikáját.

3.7. Zsírsavak hatása a sejtfunkciókra

A hosszú szénláncú PUFA-kat gyulladásos betegségek kezelésére és az autoimmunitás leküzdésére használják a gyógyászatban. Több tanulmány *in vivo* és *in vitro* gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatásukról számol be [25-32]. A PUFA-k dóziszfüggően gátolják a jelátvitelt mind CD3-on, mind CD59-en keresztül stimulált Jurkat T sejteken, míg SFA-k és egyszerűen telítetlen zsírsavak (MUFA) nem változtatják meg a Ca^{2+} választ [25]. A legnagyobb érdeklődésre két n-3 PUFA, a DHA és az eikozapentaénsav (EPA) tart számot. Ezek a hidegvízi halak olajából származó zsírsavak gátolják a limfocita-proliferációt és a makrofág-aktivációt azáltal, hogy egyrészt elnyomják az AA-ból származó eikozanoidok termelődését, amelyek módosítják a gyulladást elősegítő és immunszabályozó citokinek termelődését, másrészt a perifériás mononukleáris sejtek által termelt interleukin (IL)-1, IL-6, tumor nekrozis factor (TNF) és IL-2 *ex vivo* termelődésének csökkenését eredményezik [26]. Jenski és munkatársai (1998) [27] kimutatták, hogy a DHA gátolja a Con A-indukált mitogenezist és a kevert limfocita-reakciót, míg egyidejűleg erősíti az anti-Thy-1 antitestekkel stimulált proliferációt.

Az eikozanoidok szintén hatékony modulátorai a limfocita-funkciónak. Az IL-1-stimulált proliferáció koncentrációfüggő gátlását fedezték fel különböző PUFA-k esetében: a C20 zsírsav dihomó- γ -linolénsav (DGLA), AA és EPA, a C18 zsírsav LA, α -linolénsav és γ -linolénsav [28]. A DGLA, az AA és az EPA az IL-2-stimulált proliferációt szintén gyengíti. A zsírsavak hatékonysága a következő: $\text{AA} > \text{EPA} \geq \text{DGLA} > \text{LA}$. A PA és a MUFA OA semmiféle hatást nem fejt ki sem a bazális, sem az IL-1-stimulált proliferációra. Rotondo és munkatársai feltételezése szerint a zsírsavaknak a sejtproliferációra kifejtett gátló hatása nem más metabolitokká történő átalakulás eredménye, hanem közvetlen hatás. Továbbá az AA, a DGLA, az EPA, az OA és a LA növeli az IL-1 felszabadulását $\text{AA} > \text{EPA} \geq \text{DGLA} > \text{LA} >$

OA sorrendben, míg a PA-nak nincs hatása [29]. A sejtmembránban megjelenő eikozanoidok mennyiségét és fajtáját a táplálékkal felvett zsír típusa befolyásolhatja.

A PUFA-khoz hasonlóan a PUFA-kat tartalmazó triacil-glicerinek is dóziszfüggő módon elnyomják a Con A-stimulált limfocita-proliferációt patkányban, míg az SFA-kat vagy OA-at tartalmazó triacil-glicerinek nem gátolják az említett sejtválaszt [32]. E vegyületek időfüggő módon beépülnek a limfocita-lipidek közé: az OA nagy része a celluláris triacil-glicerinek közé, míg a LA főként a foszfolipidekbe. Ezek a limfocita-funkcióra kifejtett közvetlen hatások magyarázatul szolgálhatnak a gyulladásos betegségekben szenvedő betegek állapotában PUFA-ban gazdag étrend következtében beálló javulásra, melyet egyes klinikai vizsgálatok során tapasztaltak.

A zsírsavak hatásának mechanizmusát nem ismerjük jól. Korábbi feltételezések szerint a PUFA-k néhány hatását a képződő eikozanoidok mennyiségének és típusának módosulása okozza. Ez magában foglalhatja a membránszerkezetre, az eikozanoid-termelődésre és a lipid-peroxidációra kifejtett hatásokat. Ugyanakkor ezek a zsírsavak eikozanoid-független úton is kifejthetik hatásukat. Például az AA megemelkedett szöveti szintjei közvetlen és közvetett úton egyaránt befolyásolhatják a szívizmot és a sérült szívizomsejtekkel szomszédos egészséges szívsejteket [38]. Az AA közvetlenül hathat az ioncsatorna-aktivitásra, a jelátvitelre és a szubsztrátum-metabolizmusra, így befolyásolva az ischémiás/újrapperfundált szívizom működési karakterisztikáját, ugyanakkor a közvetett hatásokat az AA metabolitjai, pl. az eikozanoidok okozhatják.

A sejtmembrán PUFA-val történő dúsítása szelektíven módosítja a detergens-rezisztens membrándoméneket (DRM) citoplazma felőli rétegét [25]. Úgy vélik, az okozza a T sejt-aktiváció PUFA-indukált gátlását, hogy a PUFA-k kiszorítják a DRM-ek citoplazma felőli rétegéből a jelátvitelben fontos szerepet játszó, az Src családba tartozó Lck protein-kinázt. Anel és mts. [213] kimutatták lipid kettősréteg vezikulákban és citotoxikus T sejtekben (CTL), hogy csak a cisz-telítetlen zsírsavak változtatják meg a lipidbeli acillánc-rendezettséget, ami gátolja a sejtfunkciót, a transz-telítetlen zsírsavak viszont nem befolyásolják a lipidek rendezettségét.

3.8. Zsírsavak hatása ioncsatornákra

A plazmamembránban bekövetkező változások kihathatnak a csatornák állapotaira, a működésük során lejátszódó konformáció-változásokra, a csatornák kapuzását jellemző biofizikai paraméterekre, például az aktivációs és inaktivációs kinetikájukra. Kimutatták,

hogy a membránbeli zsírsavak számos ioncsatorna, köztük a K^+ csatornák működését szignifikánsan befolyásolják [21, 34-37]. Sok zsírsav közvetlenül hat a csatornaműködésre [36, 38, 214, 215.].

Telített és telítetlen hosszú láncú acil-CoA-észterek (LC-CoA), a szabad zsírsavak metabolikusan aktív formái a K_{ATP} csatornák dózisfüggő, gyors és hosszan tartó reverzibilis nyitását indukálják hasnyálmirigy β -sejteken, míg a malonil-CoA vagy a szabad CoASH hatástalanok a K_{ATP} csatornákra [216]. A PUFA LA meggátolja a neuronális halált, ahol a háttér K^+ csatornák – mint a TREK-1 és a TRAAK, amelyeket az AA és más PUFA-k, mint a DHA és a LA aktiválnak – nyitása szignifikáns tényező. Ezek a csatornák érzéketlenek az SFA-kra, amelyek nem nyújtanak neuroprotekciónak [217]. A telítetlen szabad zsírsavak, mint az OA, a LA és az AA, reverzibilisen gátolják a szívpitvar-sejteken és a hippocampusz neuronjaiban található natív K_{ACh} csatornák és az oocitákban expresszált rekombináns K_{ACh} csatornák (GIRK1/4 és GIRK1/2) ATP függő kapuzását és a K_{ACh} csatornák kinetikájában a PIP_2 által indukált változásokat [36]. A telítetlen és a közepes lánchosszúságú (C10-C14) telített zsírsavak gyorsítják a feszültségfüggő K^+ áram inaktivációját neuroblasztóma sejteken [218]. Az OA gátolja a tranziens kifelé egyenirányító K^+ áramot idős emberi szív pitvarában [219]. Az AA T84 sejteken aktiválja a Ca^{2+} független K^+ csatornákat azáltal, hogy növeli a nyitva tartási valószínűséget (P_O) és csökkenti a csatornák átlagos zárva tartási idejét [214a], cisz-telítetlen linoleát hatására a Ca^{2+} független K^+ csatorna P_O -ja szintén növekszik, de nem változik a transz-telítetlen elaidát és a telített mirisztát hatására [214, 220]. Ugyanakkor hatékonyan gátolja a Ca^{2+} aktivált K^+ (K_{Ca}) csatornákat mind az AA, mind a cisz-telítetlen linoleát, a transz-telítetlen elaidát, mind a telített mirisztát T84 sejteken [214, 220]. Egyes zsírsavak, mint pl. az AA, a mirisztinsav, a LA, a palmitolsav és a PA, közvetlenül növelik a BK_{Ca} csatornák aktivitását nyúl koszorúér simaizom-sejteken. A hosszú láncú zsírsavak hatékonyabbak, mint a rövid láncúak, és nincs statisztikai különbség a telített és a telítetlen zsírsavaknak a BK_{Ca} aktivitásra kifejtett hatásában [221]. A negatív töltésű fejcsoporttal és az eléggé hosszú szénlánccal ($C>8$) rendelkező zsírsavak növelik a nagy vezetőképességű Ca^{2+} aktivált K^+ (BK_{Ca}) csatorna aktivitását (vagy a nyitott csatornák átlagos számát, az NP_O -t) nyúl tüdőartériában. A pozitívan töltött lipidek, mint a szfingozin, amelyeknek eléggé hosszú alkiláncuk van ($C\geq 8$), az NP_O csökkenését eredményezik, semleges és rövidláncú lipidek nem változtatják meg az NP_O -t. A BK_{Ca} csatornák zsírsavakkal vagy más töltött lipidekkel történő módosítása valószínűleg azoknak közvetlenül magával a csatornafehérjével vagy néhány más csatorna-asszociált komponenssel kialakított kölcsönhatása révén valósul meg [222]. Az n-3 PUFA-k a szívben található feszültségfüggő ioncsatornák működését egyaránt

befolyásolják: mind a feszültségfüggő Na^+ áramot, mind az L-típusú Ca^{2+} áramot, mind a tranziens kifelé irányuló K^+ áramot (I_{to}), mind pedig a késleltetett egyenirányító (I_{K}) áramot koncentrációfüggő módon gátolják, és egyensúlyi inaktivációjuk feszültségfüggését hiperpolarizáció irányába tolják el [215], ezáltal antiarritmiás hatást fejtenek ki. Xiao és mts. [215] feltételezése szerint a zsírsavak nem direkt hatást gyakorolnak az ioncsatornafehérjékre, hanem a membránba nem-specifikusan beépülve a csatornafehérje közvetlen közelségében fejtenek ki primer hatást. Ezt az elképzelést támasztja alá az a megfigyelés, hogy nem-ionos detergenssek hasonlóan befolyásolták a vizsgált ioncsatornák működését [223-225], illetve hogy az n-3 PUFA-k többfajta ioncsatornára is hatást gyakorolnak [226]. Egy másik lehetőség, hogy a PUFA-k a csatornafehérje specifikus helyére kötődve fejtik ki hatásukat. Erre utal, hogy vannak olyan csatornák, amelyek működését a PUFA-k nem befolyásolják, amelyek szerkezete eltérő lehet azoktól a csatornákétól, amelyekre a PUFA-k hatást gyakorolnak; ezen felül pedig beszámoltak olyan esetről is, amikor a PUFA-k befolyásolták a Na^+ csatornák működését, míg a nem-ionos detergens Triton-X100 nem eredményezett szignifikáns változást a csatorna működésében [227].

Az előzmények ismeretében feltételeztük, hogy a zsírsavak befolyásolják a humán perifériás limfociták (HPL) $\text{K}_{\text{v}}1.3$ csatornáinak működését, és indokoltnak tartottuk e csatornák funkciója és bizonyos zsírsavak közötti kapcsolat vizsgálatát.

3.9. A jelátviteli folyamatokról

A többsejtű élőlényekben az egyes sejtek szaporodásában, differenciálódásában és anyagcseréjében alapvető szerepet játszik a sejtek közötti kommunikáció. Az információt leggyakrabban extracelluláris hírvivő molekulák (pl. neurotranszmitterek, hormonok, növekedési faktorok) közvetítik [228, 229]. A hírvivő molekulákon alapuló jelátviteli folyamatok során egy külső kémiai inger váltja ki a sejtválaszt. A célsejt a hozzá eljutó jel-molekulát specifikus receptor segítségével érzékeli, majd a jel értelmezése után válaszol, ami a sejt metabolikus folyamatainak vagy génkifejezésének megváltozásában nyilvánul meg. A receptorokhoz specifikusan kötődő természetes vegyületek a ligandumok, azok hasonló hatású szerkezeti analógjai az agonisták, biológiai választ elő nem idéző analógjaik az antagonisták. Utóbbiak a szerkezeti analógia miatti kompetíció révén képesek gátolni a ligandumok és az agonisták hatását.

A ligandum kötődése konformációs változást idéz elő a receptorban, ami különféle események sorozatát indítja el, s ez végül vagy a receptor és más fehérjék foszforilációjához

és másodlagos hírvivők felszabadulásához vagy ioncsatorna-funkció megváltozásához vezethet [230, 231]. Ennek megfelelően a jelátviteli útvonalakat két nagy csoportba sorolhatjuk aszerint, hogy receptor-foszforilációs folyamatok aktivációja vagy másodlagos hírvivők szintjének változása a meghatározó a kezdeti lépésekben. A két útvonal nem független egymástól, közöttük csatolás léphet fel [232, 233]. A jelátvitelben betöltött szerepük vizsgálható megfelelő gátlószerek alkalmazásával.

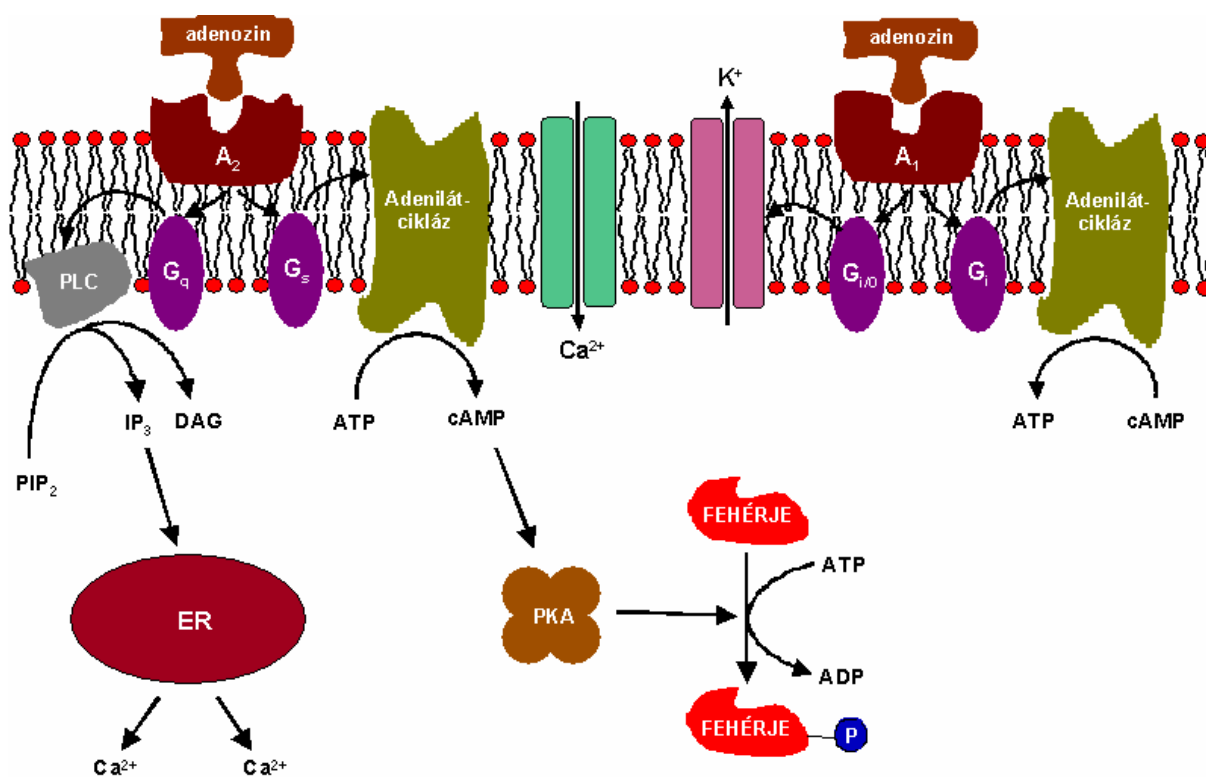
A receptor-foszforiláció révén megvalósuló jelátvitel során a receptorhoz extracelluláris oldalról történő kötődés az intracelluláris doménhez tartozó tirozin-kináz funkciót aktiválva a receptor és más, citoplazmatikus fehérjék foszforilációjához vezet. A másodlagos hírvivők közé tartozik pl. az intracelluláris Ca^{2+} , a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP), a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) és a lipid-hidrolízis melléktermékei [IP_3 , diacil-glicerin (DAG), AA] [228].

A cAMP-t az adenilát-cikláz enzim termeli ATP-ből, és a sejtben további jelátviteli lépésekben vesz részt: a cAMP-függő protein-kinázok (PKA) további aktivátora. Az adenilát-cikláz enzimet a G_s (serkentő) fehérje stimulálja, míg a G_i (inhibitor) gátolja [39, 40]. Az előbbit a koleratoxin tartósan aktiválja, az utóbbit a *pertussis* toxin inaktíválja, így mindkét toxin a cAMP-szint növekedéséhez járul hozzá. Használatukkal megállapítható, hogy egy adott stimulus hatására a G_i vagy a G_s által mediált jelátviteli útvonal aktiválódott-e.

3.10. Az adenzin szerepe a szervezetben

Az adenzin számos biológiai hatással rendelkezik. A szervezet szinte valamennyi sejtjében megtalálható, onnan megnövekedett oxigénszükséglet/oxigénellátás arány esetén szabadul fel az extracelluláris térbe [41], és a sejtfunkciók endogén modulátoraként viselkedik úgy a központi idegrendszerben, mint a perifériás szövetekben. Neurotranszmitter tulajdonsága mellett tágítja a koszorúereket [42], csökkenti a perifériás ellenállást [43], a szívben csökkenti a pacemaker-aktivitást [44], antiaritmiás hatású [45], bradikardizációt okoz [46], továbbá gátolja a trombocita-aggregációt és a preszinaptikus purinerg receptorok aktiválásával különböző neurotranszmitterek felszabadulását [47]. Véd az agy és a vázizomzat oxigénhiányos állapotban bekövetkező károsodása ellen, az agyi erek és a vázizmok relaxációját is kiváltja [48-51], tengerimalac pitvari szívizomzatban csökkenti a kontraktilis erőt, az aortában pedig relaxációt vált ki [52]. A tüdő artériáiban ezzel szemben kontrakciót indukál, ami a légzési ritmust befolyásolja [53].

Az adenosin a hatását a sejtmembránban található receptoraihoz (az adenosin-receptorokhoz) kapcsolódva fejt ki (4. ábra). A_1 receptorhoz kapcsolódva G_i fehérjén keresztül gátolja, A_2 receptorhoz kapcsolódva G_s fehérjén keresztül stimulálja az adenilát-cikláz. G fehérjék (G_q) közvetítésével a foszfolipáz C (PLC) enzim működését is befolyásolhatja, melynek megnövekedett aktivitása az IP_3 termelésén keresztül az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} felszabadulást eredményezhet. Az adenosin kifejezheti hatását másodlagos hírvivők nélkül is: az A_1 receptorok aktivációját követően G fehérje ($G_{i/o}$) K^+ csatorna-aktivációt közvetíthet (G_0 a PLC-hez kapcsolódó serkentő G fehérje).



4. ábra. Az adenosin által kiváltott jelátviteli folyamatok

Az adenosin az A_1 receptorokhoz kapcsolódva G_i fehérjén keresztül gátolja az adenilát-cikláz enzimet vagy G_K fehérjén keresztül K^+ csatornát aktivál. Ha az adenosin A_2 receptorhoz kapcsolódik, akkor G_s fehérje közreműködésével serkenti az adenilát-cikláz működését vagy G_p fehérje közvetítésével a PLC enzim aktivitását növeli. (G_s : serkentő G fehérje, G_i : inhibitor G fehérje, G_q : enzimműködést befolyásoló G fehérje, $G_{i/o}$: K^+ csatorna-aktivációt közvetítő G_i vagy G_0 fehérje, G_0 : a PLC-hez kapcsolódó serkentő G fehérje; PLC: foszfolipáz C, PKA: protein-kináz A, ER: endoplazmatikus retikulum.)

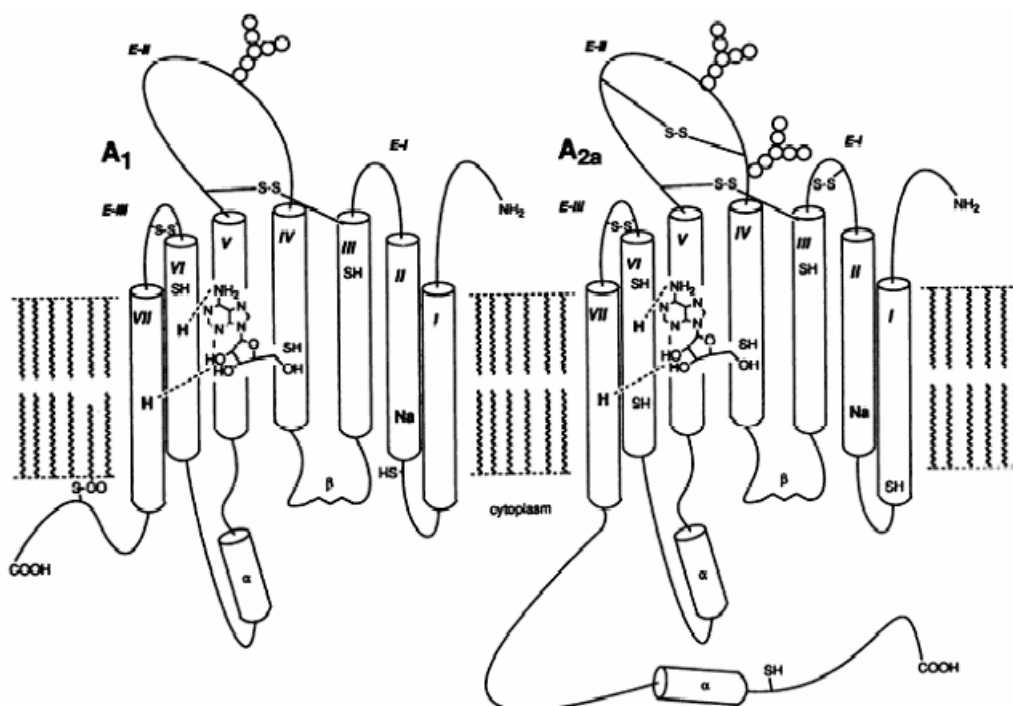
3.11. A purinerg receptorok osztályozása

A purinerg (P) receptorok vagy purinoceptorok a purin-nukleotidok és –nukleozidok receptorai: endogén ligandumaik az adenosin, az AMP, az ADP, az ATP és a diadenozin-tetrafoszfát; e receptorok az adenosin fiziológiai hatásait közvetítik. Osztályozásuk az egyes receptorokra ható agonisták és antagonisták, a szignáltranszdukcióban részt vevő mechanizmusok típusa, illetve a ligandum–receptor kölcsönhatásnak az adenilát-cikláz aktivitására kifejtett hatása alapján, Burnstock javaslata szerint történik [54]. Ennek megfelelően adenosinra (adenin-nukleozidra) érzékeny P_1 és ATP-re (adenin-nukleotidra) szelektív P_2 típusokra különíthetjük el őket. Így a P_1 receptorok azonosak az adenosin-receptorokkal.

A P_1 receptorok természetes liganduma tehát az adenosin, agonista-preferenciájuk az adenosin > AMP > ADP > ATP irányban csökken. Közös jellemzőjük, hogy hatást gyakorolnak a cAMP-re, viszont nem befolyásolják a prosztaglandin képződését. Valamennyi adenosin-receptor hét α -helikális transzmembrán doménnel rendelkezik (5. ábra), és effektor mechanizmusa G fehérje-kölcsönhatásokon keresztül valósul meg. Különböző adenosin-analógokkal szemben mutatott eltérő szelektivitásuk alapján, valamint rekombináns adenosin-receptorok aminosav-szekvenciáinak vizsgálatával további A_1 , A_{2a} , A_{2b} és A_3 alosztályokra oszthatók [55]. Az e receptor-altípusok hatásai közötti kölcsönhatás komplex szabályozó mechanizmusra enged következtetni.

Az A_1 receptorok által mediált jelátvitel a G_i és G_o proteineken keresztül történik [234, 235], így ezek a receptorok gátolják az adenilát-cikláz aktivitását (vagyis a cAMP képződését) [236, 237] (4. ábra), ezen túlmenően pedig fokozzák a membrán K^+ konduktanciáját [238], a Ca^{2+} és protein-kináz C szignált [239, 240], ugyanakkor csökkentik a membrán Ca^{2+} konduktanciáját [241]. Az A_1 -en keresztül kifejtett hatás blokkolható *pertussis* toxinnal (PTx). Az A_{2a} és az A_{2b} receptorok G_s protein-csatoltak, egyik közös sajátosságuk az adenilát-cikláz aktivitásának fokozása. E két receptor-altípus jelentős szekvencia-homológiát és alapvetően hasonló jelátviteli mechanizmusokat mutat, és könnyen megkülönböztethetők farmakológiai jellegzetességeik alapján. Az A_3 receptorok szintén adenilátcikláz-gátló hatásúak, G_i protein-csatoltak [55].

A P_2 típusú receptorok természetes ligandumai az ATP, az ADP és a diadenozil-tetrafoszfát, preferenciájuk ATP > ADP > AMP > adenosin irányban csökken. A prosztaglandin szintézisét indukálják, a cAMP-re gyakorolt hatásuk nincs. Lehetnek G fehérjéhez csatolt metabotróp vagy *intrinsic* ioncsatorna-aktivitással rendelkező ionotróp



5. ábra. A₁ és A_{2a} adenosin-receptorok felépítése [Fredholm és mts., 1994]

Az adenosin-receptorok hét α -hélikális transzmembrán doménnel rendelkeznek, melyeket extra- (E-I–III) és intracelluláris hurkok kötnék össze. Az N-terminális vég az I. domén extracelluláris oldalán található, a C-terminális vég a VII. domén intracelluláris oldalához kapcsolódik. A feltételezett adenosinkötő hely a VI. és a VII. domének hisztidin (H) oldalláncai, ahová az adenosin hidrogénkötéssel kapcsolódik, a purin N⁶- és a ribóz 2',3'-pozíciókban. A glikoziláció az E-II-n történik.

receptorok [242]. Működésük és előfordulási helyük alapján további alosztályokra oszthatók, melyeket kezdetben P_{2X}, P_{2Y}, P_{2T}, P_{2Z}, P_{2U}, P_{2S}, P_{2N}, P_{2D} nevekkel illették [55], manapság azonban inkább két nagy csoportot különböztetnek meg az átviteli mechanizmusuk és a nukleotid receptorok klónozási vizsgálatai alapján, Abbraccio és Burnstock (1994) [243] javaslata szerint: a ligandum-kapuzott ioncsatorna receptorok P_{2X} családját, melynek hét tagját ismerünk, és a G fehérje-kapcsolt P_{2Y} receptorok családját, melyen belül nyolc altípust azonosítottak [242].

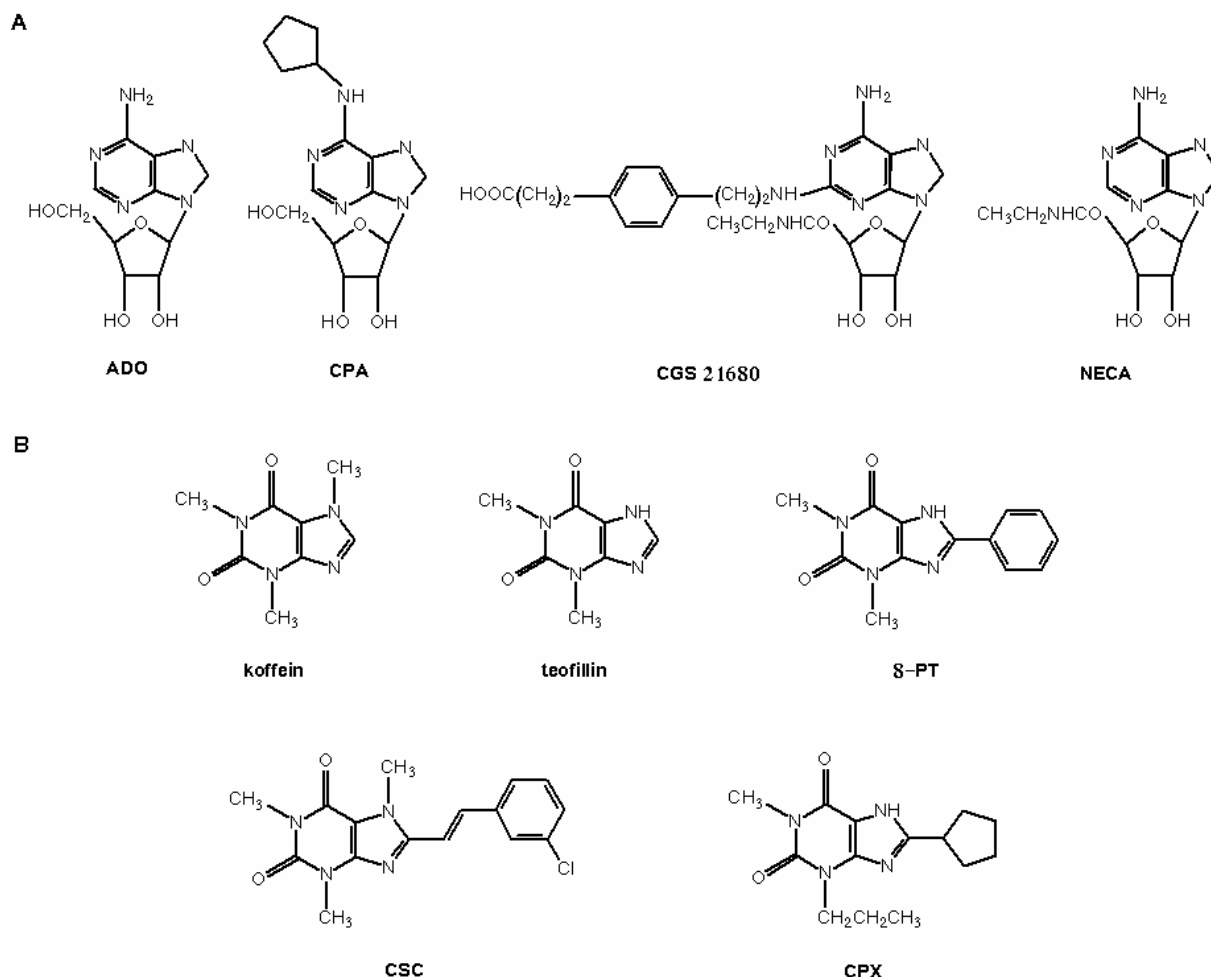
3.12. Adenosin-agonisták és –antagonisták

A különböző szöveti adenosin-receptorok tipizálására részben specifikus adenosin-analógokat, részben szelektív adenosinreceptor-antagonistákat használnak (6. ábra).

Az adenosin-agonisták valamennyien adenosin-származékok; lehetnek N⁶-, 2-szubsztituáltak vagy az adenosin 5-karboxamid-származékai. A szerkezet szoros

összefüggésben van a szelektivitással [244]. Az N⁶-szubsztituált adenzinok általában A₁ szelektívek, pl. az N⁶-ciklopentil-adenozin (CPA) [245]; a 2-helyzetben módosított adenzinok hatékony és szelektív A₂ agonistáknak bizonyultak [246], pl. a 2-[p-(2-karbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etil-karboxamido-adenozin (CGS 21680) szelektív A_{2a} agonista; az 5'-szubsztituált analógok nem szelektívek, pl. a NECA egyaránt rendelkezik A₁, A_{2a}, A_{2b} és A₃ agonista tulajdonsággal [247]. A₃ szelektív agonistákat az N⁶-, 2- és 5'-módosítások kombinációjával lehet előállítani [248].

Az adenzin-antagonisták lehetnek xantin- (pl. koffein-) vagy nem-xantin-származékok. A xantin-származékok között megkülönböztethetünk egyszeresen szubsztituált vagy többszörösen, 7-metil-, 8-cikloalkil-csoportokkal szubsztituált vegyületeket. Néhány 8-sztilil-



6. ábra. Adenzin-agonisták és –antagonisták

A) Agonisták. Az adenzin-receptorok liganduma az adenzin (ADO). A CPA A₁ szelektív, a CGS 21680 A_{2a} szelektív, a NECA nem szelektív agonista. **B)** Antagonisták. A koffein, a teofilin és a 8-PT nem szelektív, a CSC A_{2a} típusú, a CPX erősen specifikusan A₁ receptorokra ható antagonista.

koffeinszármazék nagy affinitású, specifikus A_{2a} típusú antagonistának bizonyult [249], pl. a 8-(3-klórsztril)-koffein (CSC). Az 1,3-dipropil-8-ciklopentil-xantin (CPX vagy DPCPX) erősen specifikus A₁ receptor-antagonista [250]. A koffein, a teofillin és a 8-fenil-teofillin (8-PT) nem szelektívek [251]. A nem-xantin-származékok kisebb szelektivitással rendelkeznek, mint a xantin típusú vegyületek. a ZM 241385 nem-xantin típusú A_{2a} szelektív antagonistája

Az adenosin-receptorok szervezeten belüli eloszlása PET technikával, az egyes agonisták és antagonisták pozitront emittáló atommal jelzett formáinak használatával vizsgálható [58]. A technika nagy affinitású és szelektív radioaktív ligandumot igényel. Ilyen bizonyítottan alkalmas radioligandum a ¹⁸F-NECA, ami a NECA radioaktívan jelölt származéka [59, 60]. A vegyület receptorokhoz történő kötődési tulajdonságainak, illetve az általa okozott fiziológiai funkciókbeli változásoknak a megismerésére további vizsgálatok szükségesek.

3.13. Az ioncsatornák kölcsönhatása az adenzinnal és a purinerg receptorokkal. A DDT₁ MF-2 sejtek mint farmakológiai tanulmányok alanyai

Bár az adenosin-receptorok legismertebb jelátviteli útvonala az adenilát-cikláz aktivitásának fokozása vagy gátlása, az adenosin sok hatása együtt jár a membrán vezetőképességének megváltozásával, különösen a K⁺ és/vagy Ca²⁺ csatornák konduktanciájának módosulásával, s így – természetesen – membránpotenciál-változással is. Például az adenosin szelektíven gátolja a nem-inaktiválódó K⁺ áramot szarvasmarha mellékvese *zona fasciculata* (AZF) sejtekben, mely áram a nyugalmi potenciál beállításáért felelős, így gátlása együtt jár a membrán depolarizációjával [61]. Az adenosin növeli a K⁺ konduktanciát nyúl atrioventrikuláris csomó sejtjeiben [62]. Ugyanakkor a membrán K⁺ csatornák nyitása által kiváltott hiperpolarizációja növeli a cAMP szintet *Ciona intestinalis* zsákállatban [63]. Az adenilát-cikláz aktivitásának depolarizáló ágensek és β-adrenerg-receptor-aktiváció általi szinergisztikus stimulációját mutatták ki kisagyi neuronokban is [64]. Kimutatták, hogy kisagyi szemcsesejtekben a membránpotenciál megváltozása nem közvetlenül szabályozza az adenilát-cikláz, hanem a membrán-depolarizáció eredményeképpen kialakuló Na⁺ és Ca²⁺ influx emeli a cAMP szintet [65]. Ismert, hogy a membránpotenciál alapvető szerepet játszik a jelátvitelben, ezért indokolt lehet a membránpotenciál megváltozásának a sejtek adenosinreceptor-aktivációra történő válaszában kifejtett lehetséges szerepének tanulmányozása.

A K^+ csatornák fontos szerepet játszanak az adenzin által kiváltott relaxáció közvetítésében is simaizomsejteken [252-254]: megnövekedett aktivitásuk hiperpolarizálja a simaizomsejteket, és így a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon kevesebb Ca^{2+} tud beáramlani a sejtekbe, ezáltal csökken a simaizom-kontrakció. Ebben a folyamatban szerepet játszanak a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák és az ATP függő K^+ csatornák is: a nagy vezetőképességű Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák gátlása blokkolja az adenzin által indukált koszorúér-dilatációt [255], az ATP függő K^+ csatornák adenzin hatására történő aktivációja pedig az artéria elernyedését eredményezi [256]. Újabban feszültségfüggő K^+ csatornákra is leírták az érfal-izomtónust befolyásoló funkciót [257]. Ezért új vagy ismert adenzin-származékoknak az izomsejtek K^+ áramaira kifejtett hatásának vizsgálata egy alkalmas módszer lehet az adott származékok funkcionális vizsgálatára.

A nem-inaktiválódó K^+ áram gátlását szarvasmarha AZF sejtekben P_1 adenzin-receptor-altípusok közvetítik: A_1 , A_{2a} és A_3 szelektív agonisták gátolják az említett áramot, antagonisták hatékonyan blokkolják az áram agonisták általi inhibícióját [61]. *Xenopus laevis* follikuláris oocitáiban pedig a P_1 receptorok kifelé irányuló K^+ áramot aktiválnak [72]. Mivel a cAMP stabil analógjai K^+ áramot váltanak ki, így feltételezhető, hogy az adenzin-receptorok stimulálják az adenilát-cikláz rendszert, és a K^+ áramot a cAMP-szint változásai módosítják.

A szíriai aranyhörcsög ondóvezetékének szteroidindukált leimioszarkóma tumorából származó DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek [258] P_2 receptorok mellett [66] nagyszámú A_1 és A_2 típusú adenzin-receptort expresszálnak [67, 68, 259]. Igen érzékeny adenilát-cikláz rendszer található bennük [69], mely kapcsolatban áll az A_1 és A_2 receptorokkal. A sejtvonal β_2 - [69] és α_1 -adrenoceptorok [260], H_1 hisztamin-receptorok [261] és P_2 purinoceptorok [262] által indukált ionáramok tanulmányozásának modellje. Patch-clamp vizsgálatokkal igazolták, hogy feszültségfüggő lassú, kifelé egyenirányító K^+ csatornák és gyors, befelé egyenirányító Na^+ csatornák [70], valamint Ca^{2+} -tól és inozitol-1,3,4,5-tetrakiszfoszfáttól (IP_4) egyaránt függő K^+ csatornák [71] vannak jelen az említett sejtvonalon. A P_2 receptorokról kimutatták, hogy membránáramot indukálnak a DDT₁ MF-2 sejteken: az ATP aktiválja a purinoceptorok által irányított ioncsatornákat: gyors befelé folyó Ca^{2+} áramot generál, amit tranziens, Ca^{2+} - és GTP-függő, kifelé folyó K^+ áram, majd egy nem specifikus, lassan csökkenő, befelé folyó áram követ [262], az A_1 és A_2 receptorokat pedig glükokortikoidok különbözőképpen szabályozzák, és ez jelentős hatással van a cAMP felhalmozódásra [263]. Az előbbieket alapján itt is feltehető a P_1 mediált K^+ csatorna-aktiváció. Ily módon lehetőség nyílna ezen sejtek

farmakológiai felhasználására: az A_1 és A_{2a} receptor-mediált mechanizmusok és feszültségfüggő membránáramok ugyanazon sejtvonalon történő tanulmányozására.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Reagensek

Valamennyi alkalmazott anyag analitikai vagy spektroszkópai tisztaságú volt. A zsírsavakat (PA, SA, OA, LA, AA, DHA), a 4-AP-t, a TEA-t, a NECA-t, a Histopaque-1077 szeparáló oldatot, az RPMI-1640-et, a phytohemagglutinin A-t (PHA), az L-glutamint, a *foetal bovine serum*ot (FBS), a DMEM-et (Dulbecco's modified Eagle's medium) és a szervesetlen vegyületeket a Sigma Chemical-től (St. Louis, MO, USA), az IL-2-t a Hoffmann La Roche Inc-től (Nutley, NJ, USA), a ZM 241385-öt a Tocris-től (Bristol, UK), a glibenclamidot a Richter Co-től (Budapest, Mo.) vásároltuk. A Gentamycint gyógyszerári kereskedelmi forgalomban szereztük be. A ^{19}F -NECA a DE PET Centrumában készült. A K^+ csatorna-blokkolókat az Alomone Labs Ltd-től (Jerusalem, Israel) rendeltük.

A törzsoldatok készítéséhez az adenozinreceptor-ligandumokat DMSO-ban oldottuk fel, és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, sötétben tároltuk. A kísérletekhez a törzsoldatok hígításait a mérések napján frissen készítettük. A DMSO végkoncentrációja nem haladta meg a 0,5 % (V/V)-ot.

A *Hank's balanced salt solution*-höz (HBSS) (Sigma Chemical, St. Luis, MO, USA) 25 mM Hepes-t adtunk $\text{pH}=7,4$ mellett. A *phosphate buffered saline* (PBS) 140 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 8 mM Na_2HPO_4 -ot és 3 mM NaH_2PO_4 -ot tartalmazott, $\text{pH}=7,4$ volt.

4.2. A zsírsavak kötése a FBS-hez

A különféle zsírsavakat absz. etanolban oldottuk, majd telített, etanolos, karbonátmentes KOH-oldattal titráltuk fenolftalein indikátor jelenlétében. Az oldószert az oldaton történő N_2 -átbuborékolatással, N_2 atmoszféra alatt lepároltuk. A visszamaradt anyaghoz azonnal hozzáadtuk az FBS-t (2 cm^3 oldatot 100 μmol zsírsavhoz), és az oldatot 1 h-ig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. A képződött komplexet felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, és frissen adtuk (5 μl) a sejtenyésztő tápoldathoz (5 cm^3).

4.3. A sejtek kinyerése és tenyésztése

A limfocitákat egészséges önkéntes donorok humán perifériás véréből sűrűséggradiens

centrifugálással, Histopaque-1077 szeparáló oldat (sűrűség: 1,077 g/cm³) felhasználásával nyertük. A vér hígítására és a mononukleáris sejtek mosására 25 mM Hapest tartalmazó HBSS-t (pH=7,4) használtunk. A limfocitákat (2·10⁶ sejt/cm³) különböző telített, valamint telítetlen – FBS-hez kötött – zsírsavakat tartalmazó (50 μM) és kontroll tápoldatokban 3 napig 37 °C-on, 5 % CO₂-tartalmú, nedvesített levegőjű inkubátorban, petri csészékben (d=3 cm) tenyésztettük. Tápoldatként 15 mM szabad sav Hapest, 10 % (V/V) FBS-t, 2 mM L-glutamint, valamint 50 mg/dm³ gentamycint tartalmazó RPMI-1640-et használtunk. A proliferáció elősegítésére 20 μg/cm³ PHA-t és 100 CU/cm³ IL-2-t adtunk a tenyésztő oldathoz [1]. A gázkromatográfiás mérésekhez 4 donor limfocitáit használtuk fel. Minden egyes donor mintáit 7 részre osztottuk, melyekből 6-ot a zsírsavakkal kezeltünk, 1-et pedig kontrollként használtunk. A *patch-clamp* mérésekhez 23 donor limfocitáit használtuk. Minden mintát két részre osztottunk, az egyiket egy adott zsírsavval kezeltünk, a másikat pedig kontrollként használtuk.

A szíriai aranyhörcsög *vas deferens* simaizomzatában szteroid-indukált leiomioszarkóma tumorból nyert DDT₁ MF-2 simaizom-sejtvonalat a European Collection of Animal Cell Cultures-től (Porton Down, Salisbury, UK) szereztük be. A sejteket 37 °C-on, 5 %-os CO₂-koncentrációjú, nedvesített levegőjű inkubátorban tenyésztettük 25 cm²-es flaskában DMEM tápoldatban, amely 2 mM L-glutamint és 10 % (V/V) FBS-t tartalmazott. A sejteket egy héten kétszer passzáltuk, melynek során eltávolítottuk a használt tápoldatot a sejtekről, majd 5 cm³ friss médium hozzáadása után sejtkaparóval felszedtük azokat. Az így kapott szuszpenzió 0,3–0,5 cm³-ét vittük tovább 8 cm³ friss tápoldatot tartalmazó flaskába.

A kísérletek előtt a sejteket kétszer PBS-ben mostuk (250g, 4 °C, 8 perc), majd a *patch-clamp* mérésekhez kb. 1 cm³ külső oldatban (l. Az *ionáramok mérése*) felszuszpendáltuk. A szuszpenziót felhasználásig jégen tartottuk. A mérésekhez a sejteket (20–40 μl szuszpenzió) 1,5 cm³ külső oldatot tartalmazó petri csészébe (d=3 cm) tettük. A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz szárazon hagytuk a limfocitákat, és a mintákból a sejtmembránt preparáltuk.

4.4. A zsírsavösszetétel vizsgálata

Az egyes limfocita-tenyészetekből a lipideket kloroform–metanol (2:1 V/V) eleggyel kiextraháltuk Folch és mts. módszere [264] szerint. Az összes foszfolipidból a zsírsav-metilésztereket 5 % HCl-tartalmú absz. metanolban 80 °C-on, 2,5 h-ig tartó transzészterifikálással nyertük. A zsírsav-metilésztereket FFAP oszlopon (30 m hosszú, 0,25

mm átmérőjű kapilláris kolonna; Supelco, Bellefonte, PA), Hewlett-Packard 6890 típusú gázkromatográfban választottuk szét. A méréseket kétszer végeztük el, és a két mérés átlagát számítottuk. A csúcsokat a Sigma-tól származó hitelesített standardok segítségével azonosítottuk.

A közölt adatok N=3 számú független kísérlet eredményeinek átlagai $\pm$ SEM (a középérték közepes hibája).

4.5. Az ionáramok mérése

Az ionáramok meghatározását *patch-clamp* technikával teljes-sejt konfigurációban, feszültség-zár üzemmódban, szobahőmérsékleten végeztük, AXON Instruments TL-1-125 és Digidata 1200 komputer interfészekhez csatlakoztatott Axopatch-200 erősítő használatával. A szűrési frekvenciát a mintavételezési frekvencia felére vagy annál kisebbre állítottuk Warner Instruments LPF-8 berendezés segítségével. A soros ellenállás 10 M Ω alatti volt, kompenzációként 75 % korrekciót és aktivációs protokoll esetében 40 % predikciót alkalmaztunk. Az adatgyűjtéshez a Clampex 8.2 (Axon Instruments, Foster City, Cal., USA) programot használtuk.

A külső oldat 145 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 10 mM Hepes, 5,5 mM glükózt, 2,5 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot tartalmazott, pH=7,35 (305 mosm/dm³). A GC 150 F-15 boroszilikát-üveg kapillárisból (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK) készült, 2-5 M Ω ellenállású pipettákat 140 mM KF-ot, 11 mM EGTA-t, 10 mM Hepes, 2 mM MgCl₂-ot, 1 mM CaCl₂-ot tartalmazó belső oldattal töltöttük meg, pH=7,23 ($\approx$ 295 mosm/dm³). Az adenozin-analóg ligandumok és antagonisták törzsoldatait a külső oldatban hígítottuk ki, majd gravitációs perfúzióval juttattuk el a sejtekhez.

A K⁺ áramok mérése:

A depolarizáló impulzusok között a feszültséget -120 mV-on tartottuk, az aktivációs kinetika jellemzéséhez a limfocitákon 15 ms-ig, a DDT₁ MF-2 sejteken 150 ms-ig, az inaktivációs kinetika jellemzéséhez a limfocitákon 1 s-ig, a DDT₁ MF-2 sejteken 2 s-ig +50 mV-ra depolarizáltuk a sejtmembránt. A depolarizáló impulzusokat 30 (aktiváció), illetve 60 s-onként (inaktiváció) alkalmaztuk az áram kumulatív inaktivációjának elkerülésére. A mintavételezési frekvencia 20, ill. 10 kHz, a szűrési frekvencia 5, ill. 1 kHz volt. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének meghatározásához limfocitákon -120 mV tartófeszültségről depolarizáltunk -70 és +50 mV

közötti feszültségértékekre 10 mV lépésközökkel, 1 s hosszúságú impulzusokkal, 10 kHz mintavételezési és 1 kHz szűrési frekvencia mellett. DDT₁ MF-2 sejtek esetében a tartófeszültséget -120 mV-ra állítottuk, -80 és +60 mV között 20 mV-os lépcsőközökkel 2 s-ig depolarizáltunk, a mintavételezési frekvencia 20 kHz, a szűrési frekvencia 5 kHz volt. Utólagos szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének meghatározásához (limfocitákon) 15 ms hosszú impulzusokkal +50 mV-ra depolarizáltunk, ezen impulzusok között a tartófeszültséget változtattuk -100 mV és -20 mV között 10 mV-os lépésközökkel, az egyes depolarizáló impulzusok között 2,5 percet vártunk az adott tartófeszültségen az egyensúlyi inaktiváció kialakulásának eléréséhez. Utólagos szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk.

A Na⁺ áramok mérése:

Az áramgörbék felvételéhez -120 mV tartófeszültségről -80 és +90 mV között 10 mV-os lépcsőközökkel 6 ms-ig depolarizáltunk a DDT₁ MF-2 sejteken, az egyes depolarizáló impulzusokat 1,5 s-onként alkalmaztuk. 50 kHz mintavételezési és 5 kHz szűrési frekvenciát, valamint *online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk.

4.6. Az adatok kiértékelése

A kiértékelésekhez Clampfit 8.2 (Axon Instruments, Foster City, Cal., USA), Microsoft Excel, illetve SigmaPlot 8.0 szoftvereket használtunk.

Azokban az esetekben, amelyekben nem *online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk, a mérések során nyert áramgörbéket a kiértékelés kezdetén szoftveresen korrigáltuk ohmikus szivárgási áramra. A görbéket digitálisan szűrőztük hárompontos *boxcar* módszerrel.

Az aktivációs időállandó meghatározásához – a Hodgkin–Huxley modellnek megfelelően, a Levenberg–Marquardt algoritmus alkalmazásával– a következő exponenciális függvénnyel illesztettünk az aktivációs protokoll esetében kapott áramgörbékre:

$$I(t) = A(1 - e^{-\frac{t}{\tau_a}})^4 + C \quad (1)$$

ahol $I(t)$ az aktuális áramerősség, A az aktiválódó komponens amplitúdója, t az idő, τ_a az aktivációs időállandó, C konstans: a feszültségtől független áramkomponens nagysága.

Az inaktivációs időállandó meghatározásához a megfelelő áramgörbe leszálló ágát a Levenberg–Marquardt algoritmus alkalmazásával a következő exponenciális függvénnyel illesztettük:

$$I(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau_i}} + C \quad (2)$$

ahol $I(t)$ az aktuális áramerősség, A az inaktiválódó komponens amplitúdója, t az idő, τ_i az inaktivációs időállandó, C konstans.

A limfocitákon található $K_v1.3$ csatornák egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggését jellemző paraméterek meghatározásához minden egyes membránpotenciálon kiszámítottuk a membrán csúcs K^+ konduktanciáját (G_K) a

$$G_K = I_K / (E_m - E_K) \quad (3)$$

képlet alapján, ahol I_K az adott membránpotenciálon mért áramamplitúdó, E_m az aktuális membránpotenciál, E_K a K^+ ionok megfordulási potenciálja, amely az általunk használt oldatok esetén -85 mV (a Nernst-egyenlettel számított érték) volt. Az aktuális G_K értékeket a legnagyobb G_K értékére normáltuk, és a normált vezetőképesség – feszültség függvényt a Boltzmann-egyenlettel illesztettük:

$$y = \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x - x_0}{s}\right)}} \quad (4)$$

ahol $a=1$, x az aktuális membránpotenciál, s_a és x_0 pedig a függvény karakterisztikus értékei, rendre a meredekség illetve az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének középpontja ($V_{1/2,a}$).

Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését szintén a Boltzmann-függvénnyel, a következő változók és paraméterek használatával jellemeztük: y az aktuális E_h tartófeszültségről $+50$ mV-ra történő depolarizáció során kapott és az $E_h = -120$ mV-ról történő depolarizáció során mért csúcsáramok aránya, x a megfelelő membránpotenciál, s_i és x_0 a függvény karakterisztikus értékei: a meredekség és az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének középpontja ($V_{1/2,i}$).

A DDT₁ MF-2 sejtek esetében a dózis–hatás görbét a Hill-egyenlettel illesztettük:

$$y = y_0 + \frac{a(EC_{50})^{n_H}}{(EC_{50})^{n_H} + x^{n_H}} \quad (5)$$

ahol y_0 konstans, $a=1$, n_H a Hill-koefficiens, EC_{50} a félhatásos dózis, x az aktuális koncentráció.

4.7. Statisztikai analízis

Az aktivációs és az inaktivációs időállandót minden sejtre legalább 3 depolarizációs impulzusból nyert érték átlagolásával határoztuk meg. A limfocitákra jellemző időállandók

tartományai és mediánjai a 3. táblázatban láthatók. Az adatok nagymértékű donorfüggő változása (lásd alább) és az időállandók nem-normál eloszlása a medián használatát tette indokolttá az átlag helyett. Ugyanezen okból kifolyólag a $V_{1/2,a}$, az s_a , a $V_{1/2,i}$ és az s_i értékeinek tartományai és mediánjai találhatóak a 4. és az 5. táblázatokban.

A HPL-k esetében minden egyes sejtpreparátumot (donoronként) kontroll (kezeletlen) és zsírsavval kezelt csoportra osztottunk, és a vizsgált sejtek száma minden donorra és csoportra 2 és 8 közötti volt. A különböző donoroktól származó, az adott zsírsavkezeléshez tartozó kontroll sejteken kapott τ_a , τ_i , $V_{1/2,a}$, s_a , $V_{1/2,i}$ és s_i értékeket Kruskal–Wallis *one way* variancia-analízis (ANOVA) *on ranks* eljárás használatával összehasonlítottuk (2. táblázat felső rész). Az analízis azt mutatta, hogy szignifikáns különbség van a különböző donorok kontroll sejtei között, különösen az aktivációs kinetikában (τ_a) és a $V_{1/2,a}$ -ban. (A 2. táblázat egyes celláiban található P értékek mutatják a Kruskal–Wallis *one way* ANOVA *on ranks* analízis eredményeit a kontroll sejtekre egy adott kezelés, de különböző donorok esetén.) Hasonlóan, néhány esetben az ugyanazzal a zsírsavval kezelt, különböző donoroktól származó sejteken mért paraméterekben is statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk (pl. a SA-val kezelt sejtek inaktivációs kinetikája, 2. táblázat alsó rész).

Ez a kontroll értékekben található különbség *ab ovo* kizárta annak a lehetőségét, hogy a különböző donoroktól származó adatokat összegyűjtsük. Ezért a 3. és az 5. táblázatban bemutatott statisztikai összehasonlításokhoz a következő, sejtenkénti normalizációs eljárást alkalmaztuk. Egy adott sejtnél (k) az x zsírsavval történt kezelésre adott választ jellemző mért paramétert (p) az ugyanannak a paraméternek az azonos donortól (d) származó kontroll (c) sejteken kapott átlagára ($\langle p \rangle$) normáltuk (pl. az aktivációs kinetikánál a $\tau_{a,k,x,d}/\langle \tau_{a,c,d} \rangle$ arányt számítottuk minden egyes sejtre). Ezután a kapott normált értékeket egyesítettük minden kezelésnél, átlagot és SEM-et számoltunk (l. 3-5. táblázat), és Student-féle t-próbát végeztünk $\mu=1$ nullhipotézis ellenében. Ez az eljárás lehetővé tette az ugyanolyan statisztikai összehasonlítást az összes kezelésre a kontroll vagy a kezelt csoportok 2. táblázatban bemutatott eltéréseinek kiküszöbölése mellett. A statisztikai szignifikancia korlátja $P<0,05$ volt. Ahol rendelkezésre állnak, átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettünk fel.

A statisztikai összehasonlításokat SigmaStat 3.11 programmal végeztük. Mind a kontrollal szemben történő, mind a páronkénti összehasonlításoknál Dunn-módszert alkalmaztunk.

A DDT₁ MF-2 sejteken végzett kísérletek önkontrollosak voltak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A citoplazma-membrán foszfolipid-összetételének hatása a K_v1.3 csatornák funkciójára humán limfocitákban

5.1.1. A zsírsavak beépülésének ellenőrzése

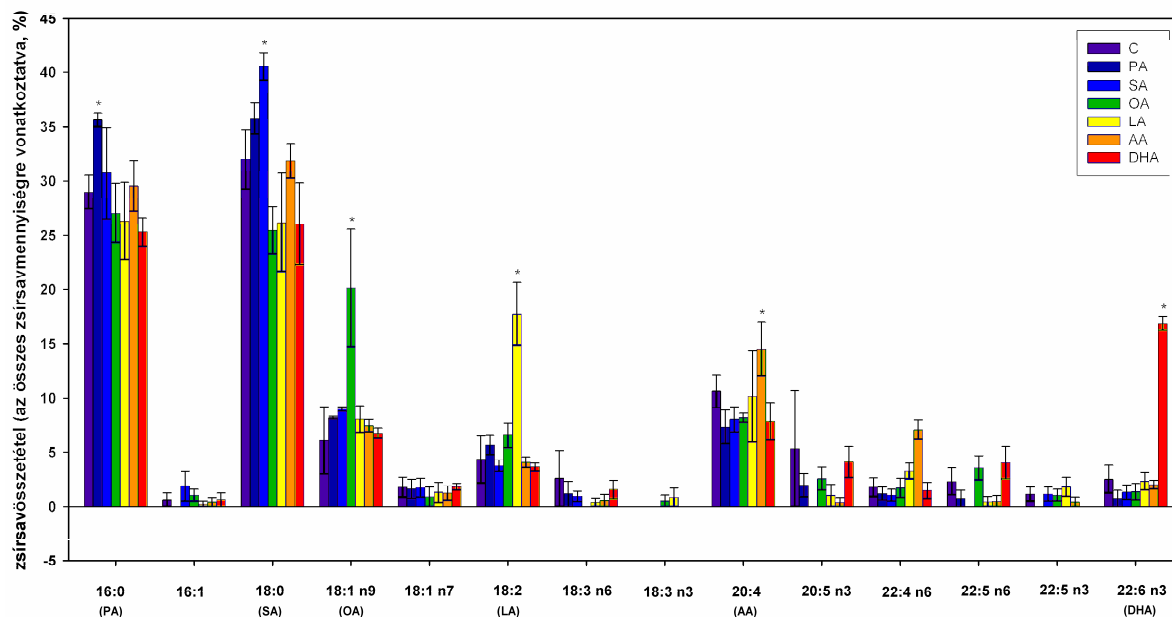
A zsírsavak limfocita-membránba történő beépülésének követésére gázkromatográfiás vizsgálatokat végeztünk, melyek eredményei az 1. táblázatban és a 7. ábrán láthatók. A kezelések hatására minden esetben statisztikailag szignifikáns növekedést tapasztaltunk a vizsgált zsírsavnak a limfocitamembránban található összes zsírsav mennyiségére vonatkoztatott relatív mennyiségében (t-próba, $P < 0,05$). A statisztikai analízis eredményei a következők: PA kezelés: $P = 0,015$; SA kezelés: $P = 0,046$; OA kezelés: $P = 0,065$; LA kezelés: $P = 0,006$; AA kezelés: $P = 0,003$; DHA kezelés: $P \leq 0,001$.

Zsírsav	Zsírsavösszetétel (az összes zsírsavmennyiségre vonatkoztatva, %)						
	C	PA kezelt	SA kezelt	OA kezelt	LA kezelt	AA kezelt	DHA kezelt
16:0	29,00 ± 1,51	35,66 ± 0,65*	30,74 ± 4,21	27,07 ± 2,71	26,31 ± 3,57	29,56 ± 2,31	25,32 ± 1,31
18:0	32,01 ± 2,71	35,82 ± 1,45	40,56 ± 1,26*	25,46 ± 2,22	26,18 ± 4,52	31,85 ± 1,60	26,06 ± 3,77
18:1 n9	6,10 ± 3,12	8,22 ± 0,13	9,01 ± 0,21	20,15 ± 5,42*	8,07 ± 1,22	7,47 ± 0,58	6,77 ± 0,49
18:2	4,32 ± 2,19	5,66 ± 0,88	3,74 ± 0,52	6,58 ± 1,15	17,75 ± 2,87*	4,05 ± 0,49	3,62 ± 0,38
20:4	10,63 ± 1,49	7,36 ± 1,57	8,05 ± 1,16	8,20 ± 0,41	10,17 ± 4,23	14,54 ± 2,49*	7,86 ± 1,73
22:6 n3	2,50 ± 1,29	0,72 ± 0,72	1,29 ± 0,65	1,34 ± 0,74	2,30 ± 0,82	1,99 ± 0,41	16,89 ± 0,65*

1. táblázat. A HPL membrán zsírsavösszetétele a gázkromatográfiás mérések alapján
Csak a kísérleteink során tanulmányozott zsírsavakat tüntettük fel a táblázatban. Az egyes adatokat $N=3$ független kísérlet (N a donorok száma) átlaga ± SEM értékben adtuk meg. A kontrolltól szignifikánsan különböző értékeket ($P < 0,05$) csillaggal jelöltük. (C: kontroll, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozaheptaénsav.)

5.1.2. A PUFA-k módosítják a K_v1.3 csatornák aktivációs és inaktivációs kinetikáját

Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a zsírsavak beépültek a sejtmembránba, meghatároztuk a K_v1.3 csatornák aktivációjának és inaktivációjának kinetikáját és egyensúlyi paramétereit.



7. ábra. Különböző zsírsavak jelenlétében tenyésztett HPL-k membránjának zsírsavösszetétele

A sejtmembrán teljes zsírsavösszetételét meghatároztuk. Azoknak a zsírsavaknak a nevét, amelyeknek a sejtek elektrofiziológiai paramétereire kifejtett hatását vizsgáltuk, zárójelben feltüntettük. A HPL-kat 3 napig tenyésztettük az adott zsírsavat (50 μ M) tartalmazó, illetve kontroll tápoldatban, és PHA-val, valamint IL-2-vel stimuláltuk. Kloroform/metanollal történő extrakció után a zsírsav-foszfolipideket absz. metanollal átészterestítettük, majd a zsírsav-metilésztereket gázkromatográfiásan, FFAP kapilláris kolonnán szétválasztottuk. A csúcsokat hitelesített standardok segítségével azonosítottuk. A közölt adatok N=3 független kísérlet átlagai $\pm$ SEM értékei. A kontrolltól szignifikánsan különböző ($P < 0,05$) értékeket csillaggal jelöltük. (C: kontroll, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozaheksaénsav.)

Azért, hogy összehasonlíthassuk a különböző kezelések hatásait, elvégeztük a mért időállandók részletes statisztikai analízisét (l. a *Statisztikai analízis* c. részt). A páronkénti összehasonlítás (Kruskal–Wallis *one way* ANOVA *on ranks*, $P < 0.05$) számos esetben szignifikáns különbséget mutatott a különböző donorok kontroll limfocitáin végrehajtott mérések esetében mind az aktivációs időállandóban (τ_a), mind az inaktivációs időállandóban (τ_i), továbbá az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének középpontjában ($V_{1/2,a}$). Más egyensúlyi paraméterek nem mutattak donorfüggést. A statisztikai analízis eredményei a 2. táblázatban találhatóak. Az időállandók értékeinek donorfüggő tulajdonsága miatt a különböző donoroktól származó limfocitákon mért adatokat nem osztottuk kontroll és kezelt csoportokra, hanem a kezelt sejteken mért értékeket normáltuk az ugyanazon donortól

származó kontroll értékekre (a részleteket l. a *Statisztikai analízis* c. részben).

A 8. ábra mutatja a normált reprezentatív áramgörbék a kontroll és a kezelt limfocitákon (A–C), valamint a $K_v1.3$ csatornák aktivációs időállandójának változásait összefoglaló illusztrációt (D).

	$P_{\tau,a}$	$P_{\tau,i}$	$P_{V1/2,a}$	$P_{s,a}$	$P_{V1/2,i}$	$P_{s,i}$
C_{PA}	0,04*	0,16	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
C_{SA}	0,07	0,06	0,01*	0,32	0,12	0,40
C_{OA}	0,04*	0,19	1,00	0,93	0,43	0,20
C_{LA}	0,03*	0,09	0,46	0,56	0,53	1,00
C_{AA}	0,25	0,25	0,19	0,51	0,80	0,43
C_{DHA}	0,07	0,93	0,03*	0,05	0,20	0,07
PA	0,001*	0,27	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
SA	0,05*	0,01*	0,19	0,42	0,21	0,72
OA	0,05	0,05	0,14	0,83	0,48	0,82
LA	0,03*	0,53	0,02*	0,59	0,17	0,71
AA	0,38	0,51	0,86	0,24	0,70	1,00
DHA	0,32	0,18	0,19	0,35	0,90	0,13

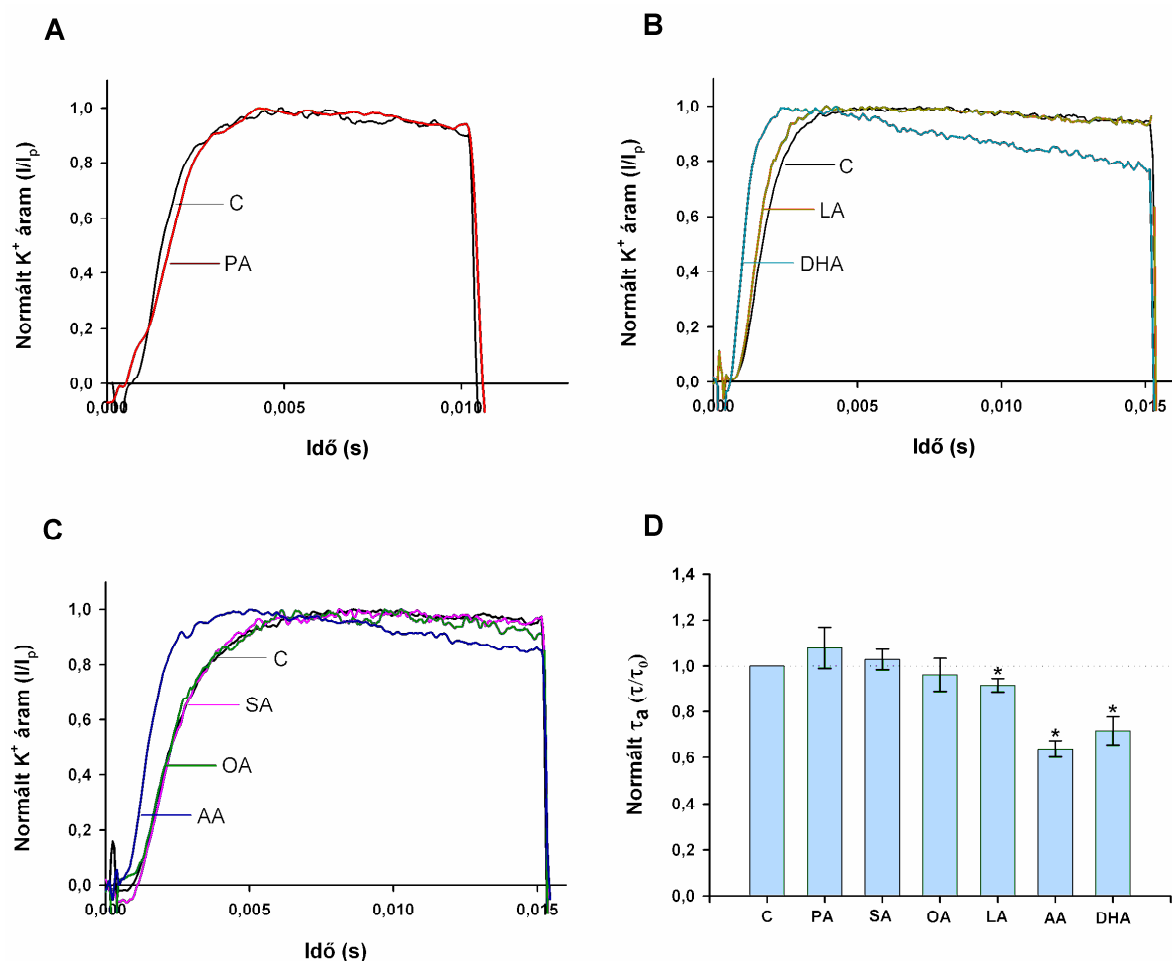
2. táblázat. A statisztikai analízis (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks, Dunn’s method) során kapott valószínűségi értékek (P)

[*: szignifikáns ($P < 0,05$), τ_a : aktivációs időállandó, τ_i : inaktivációs időállandó, $V_{1/2,a}$: fél-aktivációs feszültség, $V_{1/2,i}$: fél-inaktivációs feszültség, s: meredekség, C: az egyes kezelésekhez tartozó kontrollok értékei, a megfelelő zsírsavat alsó indexben tüntettük fel, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozaheksaénsav)]

A membrán SA-val történő dúsítása nem változtatta meg a HPL-k $K_v1.3$ csatornáinak aktivációs időállandóját. Az ugyancsak telített PA és az egyszeresen telítetlen OA esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást az aktivációs időállandóban. Ugyanakkor a PUFA-k: a LA, az AA és a DHA hatására gyorsult az áram aktivációs kinetikája, amit számszerűleg az aktivációs időállandó csökkenése fejez ki. Az aktivációs időállandóra mért értékek tartományait, mediánjait és a kontrollra vonatkoztatott arányokat a 3. táblázatban mutatjuk.

Minőségileg hasonló változásokat fedeztünk fel a $K_v1.3$ csatornák inaktivációs időállandója (τ_i) esetében is a zsírsavkezelés hatására. A 9. ábra mutatja az inaktivációs időállandó meghatározásához felvett normált, reprezentatív áramgörbék mind a kontroll, mind a különböző zsírsavval kezelt HPL-k esetében (A–C), valamint a $K_v1.3$ csatornák kontroll értékekre normált inaktivációs időállandójának változásait tartalmazó összesített

diagramot (D).



8. ábra. A zsírsavak membránba történő beépülésének hatása a $K_v1.3$ csatornák aktivációs kinetikájára HPL-kon

A HPL-kat az adott zsírsavat (50 μ M) tartalmazó, illetve kontroll tápoldatban 3 napig tenyésztettük, és PHA-val, valamint IL-2-vel stimuláltuk. **A-C)** A kontroll és a zsírsavval kezelt limfocitákon mért normált, reprezentatív áramgörbék. A sejteket -120 mV tartófeszültségről $+50$ mV-ra depolarizáltuk 15 ms-ig, a depolarizáló impulzusokat 30 s-onként alkalmaztuk. A mintavételi frekvencia 20 kHz, a szűrési frekvencia 5 kHz volt. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az áramgörbéket a Hodgkin–Huxley modellnek megfelelően illesztettük [1. Az adatok kiértékelése c. részt, (1) egyenlet]. **D)** A HPL-k $K_v1.3$ csatornáinak aktivációs időállandójában bekövetkező változások (normált adatok). A kontrolltól szignifikánsan különböző ($P < 0,05$) értékeket csillaggal jelöltük. (τ_a : aktivációs időállandó, I : t időpillanatban mért áram értéke, I_p : áramamplitúdó, τ : zsírsavval kezelt sejten kapott aktivációs időállandó, τ_0 : adott zsírsavkezeléshez tartozó kontroll sejten kapott aktivációs időállandó, C: kontroll, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozahexaénsav.)

A LA, az AA és a DHA szignifikánsan csökkentette, míg a PA, a SA és az OA hatására nem változott a limfociták inaktivációs időállandója. Az inaktivációs időállandóra kapott értéktartományok, mediánok és a kontrollra vonatkoztatott arányok a 3. táblázatban találhatók.

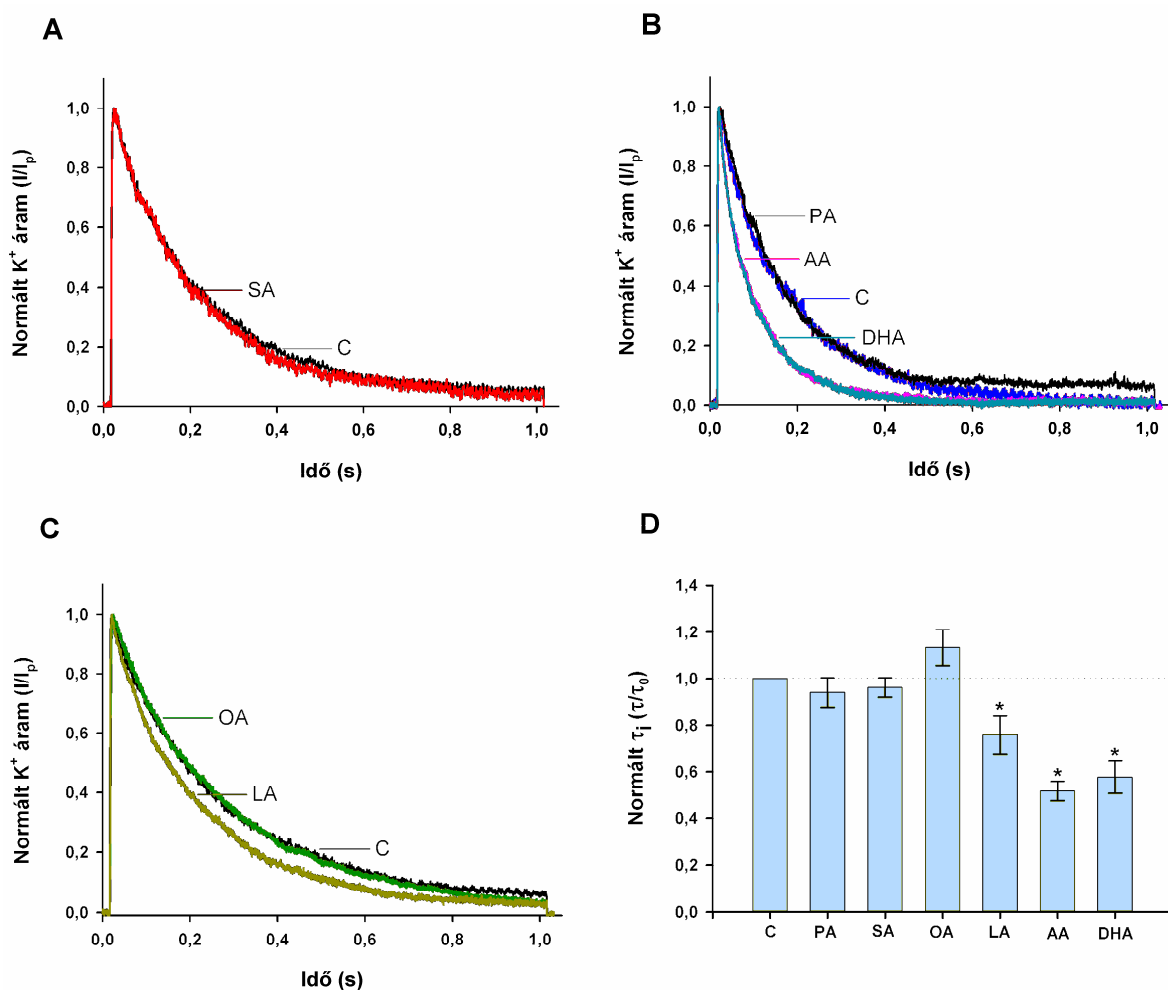
	τ_a tartomány (ms)	τ_a medián (ms)	N	τ_a arány (FA/K)	τ_i tartomány (ms)	τ_i medián (ms)	N	τ_i arány (FA/K)
C_{PA}	0,5055 – 1,114	0,7310	12		79,50 – 208,6	150,9	8	
PA	0,5431 – 1,309	0,9036	10	1,07 ± 0,14	75,06 – 173,2	87,40	9	0,92 ± 0,06
C_{SA}	0,4289 – 1,305	0,7038	30		85,70 – 282,7	176,0	23	
SA	0,4976 – 1,535	0,7416	33	1,05 ± 0,04	91,71 – 267,3	178,7	26	0,97 ± 0,03
C_{OA}	0,5455 – 1,555	0,8490	10		76,43 – 257,4	158,5	8	
OA	0,4560 – 1,605	0,8538	11	0,97 ± 0,03	124,9 – 271,5	164,2	11	1,13 ± 0,13
C_{LA}	0,5398 – 0,8179	0,7215	9		115,2 – 266,8	196,1	9	
LA	0,5045 – 0,7538	0,6433	12	0,91 ± 0,02	75,52 – 283,3	167,2	10	0,67 ± 0,08
C_{AA}	0,6465 – 1,263	0,7333	11		93,70 – 240,2	168,6	11	
AA	0,3866 – 0,6246	0,4999	13	0,64 ± 0,07	58,17 – 150,7	79,03	11	0,51 ± 0,05
C_{DHA}	0,4901 – 2,200	0,6821	15		116,8 – 372,9	163,8	16	
DHA	0,3653 – 0,8010	0,5708	15	0,73 ± 0,11	60,39 – 208,7	106,7	13	0,54 ± 0,09

3. táblázat. A mért aktivációs időállandók (τ_a) és inaktivációs időállandók (τ_i) tartományai, mediánjai és a kezelt/kontroll arányok

Az arányok legalább 3 független kísérlet eredményeképpen kapott átlag ± SEM értékek. (N: a vizsgált sejtek száma, FA: zsírsav, C: az egyes zsírsavkezelések kontrolljai, a megfelelő zsírsavat alsó indexben tüntettük fel, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozahexaénsav.)

5.1.3. Zsírsavas kezelés nem változtatja meg a $K_v1.3$ csatornák aktivációjának és inaktivációjának egyensúlyi paramétereit

A normált teljessejt-vezetőképesség (G_n) feszültségfüggése (egyensúlyi aktiváció) az ioncsatornák zárt és nyitott állapot közötti egyensúlyi megoszlását jellemzi adott membránpotenciálon. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése leírja a nem inaktiválódott csatornák arányát adott membránpotenciálon.



9. ábra. Zsírsavak hatása a HPL-k K⁺ csatornáinak inaktivációs időállandójára (τ_i)

A HPL-kat 3 napig tenyésztettük az adott zsírsavat tartalmazó (50 μ M), illetve kontroll tápoldatban, és PHA-val, valamint IL-2-vel stimuláltuk. **A–C)** A kontroll és a zsírsavval kezelt limfocitákon mért normált, reprezentatív áramgörbék. A sejteket –120 mV tartófeszültségről +50 mV-ra, 1 s-ig depolarizáltuk. A teszimpulzusokat 60 s-onként alkalmaztuk az áram kumulatív inaktivációjának elkerülése végett. A mintavételezési frekvencia 10 kHz, a szűrési frekvencia 1 kHz volt. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. **D)** A HPL-k K_v1.3 csatornáinak inaktivációs időállandójában bekövetkező változások. A kontroll sejteken mért értékekre normált adatokat ábrázoltuk. A kontrolltól szignifikánsan különböző (P<0,05) értékeket csillaggal jelöltük. (τ_i : inaktivációs időállandó, I: t időpillanatban mért áram értéke, I_p: áramamplitúdó, τ : adott zsírsavval kezelt sejten kapott aktivációs időállandó, τ_0 : az adott zsírsavkezeléshez tartozó kontroll sejten kapott inaktivációs időállandó, C: kontroll, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozahexaénsav.)

A 10. ábra mutatja a HPL-k teljes-sejt K_v1.3 áramainak reprezentatív, normált teljessejt-konduktanciáit a depolarizáló feszültség függvényében. Az illesztett görbék mutatják a legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényt. A kontroll és a zsírsavval kezelt sejtek

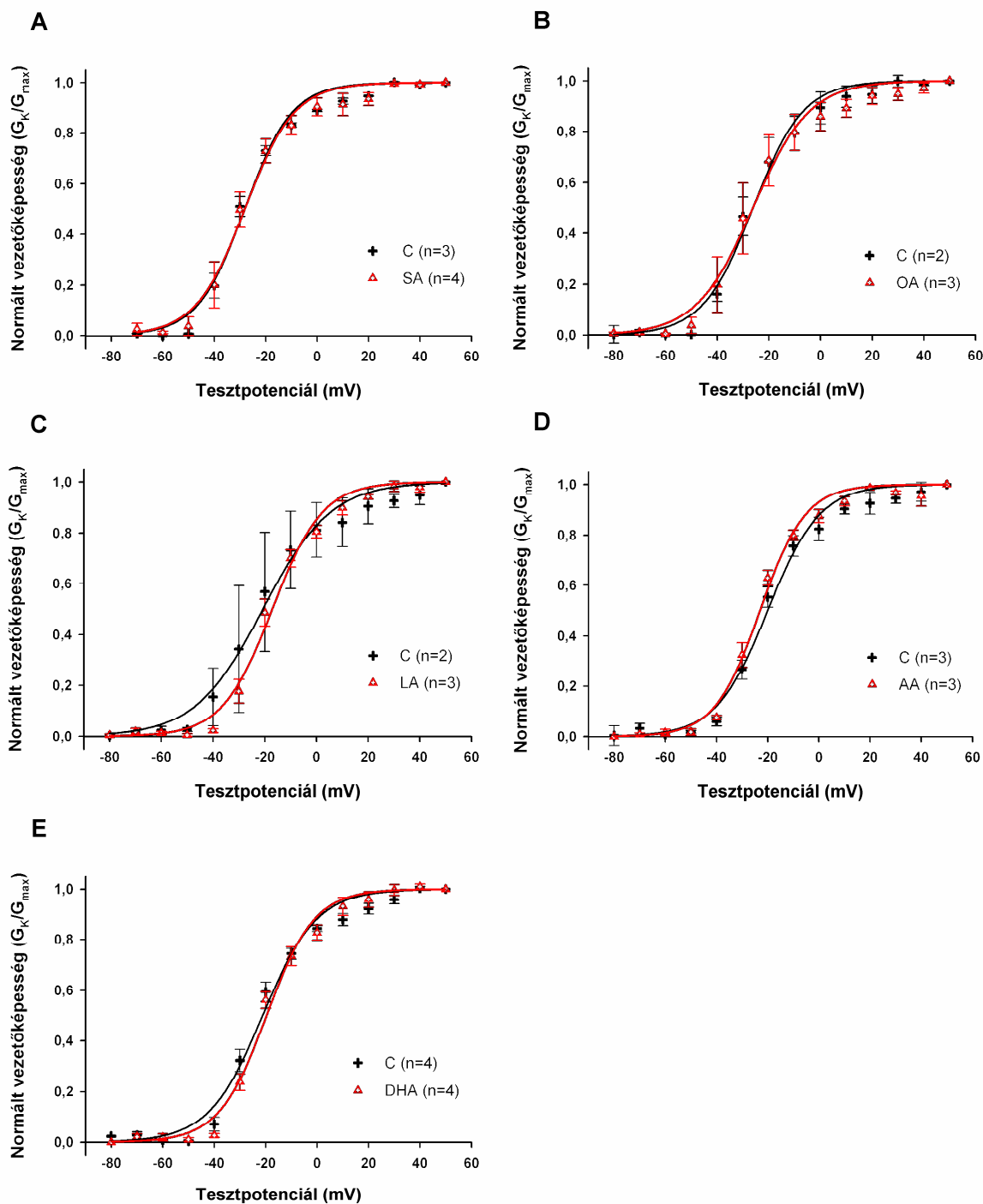
esetében kapott görbék átfednek, ez minőségileg mutatja, hogy egyetlen tanulmányozott zsírsav sem változtatta meg a $K_V1.3$ csatornák egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggését. Ezt a statisztikai analízis megerősítette (4. táblázat). A *Statisztikai analízis* c. bekezdésben részletezett megfontolások miatt a teszteket a Boltzmann-függvények normált paramétereire végeztük el. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése középpontjának és meredekségének tartományait, mediánjait és kezelt/kontroll arányait a 4. táblázat tartalmazza.

	$V_{1/2,a}$ tartomány (mV)	$V_{1/2,a}$ medián (mV)	N	$V_{1/2,a}$ arány (FA/K)	s_a tartomány (mV)	s_a medián (mV)	N	s_a arány (FA/K)
C_{SA}	-34,68 – -12,20	-24,03	32		6,35 – 11,92	9,18	32	
SA	-36,63 – -9,32	-22,41	34	$1,02 \pm 0,08$	6,39 – 14,16	9,28	34	$1,03 \pm 0,05$
C_{OA}	-31,57 – -14,95	-25,81	6		7,68 – 11,92	9,99	6	
OA	-34,80 – -14,88	-23,17	8	$1,06 \pm 0,16$	8,34 – 12,55	8,85	8	$1,04 \pm 0,05$
C_{LA}	-31,57 – -9,27	-22,22	8		2,83 – 13,99	8,06	5	
LA	-32,25 – -14,18	-25,59	10	$1,07 \pm 0,18$	2,83 – 13,99	8,90	5	$0,99 \pm 0,16$
C_{AA}	-24,12 – -15,86	-18,07	9		8,25 – 12,17	10,60	9	
AA	-26,27 – -17,47	-22,84	8	$1,13 \pm 0,04$	7,80 – 17,05	9,16	8	$1,05 \pm 0,10$
C_{DHA}	-35,17 – -18,77	-23,05	7		7,08 – 11,38	9,67	7	
DHA	-32,40 – -15,14	-20,17	6	$0,97 \pm 0,04$	7,32 – 12,12	8,89	6	$0,98 \pm 0,09$

4. táblázat. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése középpontjának ($V_{1/2,a}$) és meredekségének (s_a) tartományai, mediánjai és kezelt/kontroll arányai

Az arányokat legalább 3 független kísérlet eredményeképpen kapott átlag $\pm$ SEM értékeként adjuk meg. (N: a tanulmányozott sejtek száma, FA: zsírsav, C: a zsírsavkezelések kontrolljai, a megfelelő zsírsavat alsó indexben tüntettük fel, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozaheksaénsav.)

Zsírsavakkal végzett kísérleteink során nem tapasztaltunk szignifikáns változást a $K_V1.3$ csatornák egyensúlyi inaktivációjának feszültségfüggésében sem. A legjobban illeszkedő Boltzmann-függvénynek megfelelő reprezentatív görbéket a 11. ábrán mutatjuk. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése középpontjának és meredekségének tartományait, mediánjait és kezelt/kontroll arányait az 5. táblázat tartalmazza. A statisztikai analízist a $V_{1/2,i}$ és az s_i normált értékeire végeztük el (l. fentebb).



10. ábra. A zsírsavakkal történt kezelés nem befolyásolta a HPL-k K^+ csatornáinak egyensúlyi aktivációját (reprezentatív görbék)

A HPL-kat 3 napig tenyésztettük az adott zsírsavat ($50 \mu M$) tartalmazó, illetve kontroll tápoldatban, és PHA-val, valamint IL-2-vel stimuláltuk. Az egyensúlyi aktiváció meghatározásához a sejteket -120 mV tartófeszültségről 1 s-ig depolarizáltuk -70 és $+50$ mV közötti, 10 mV-onként növekvő feszültségekre. A depolarizáló impulzusokat 30 s-onként alkalmaztuk. Utólagos szívárgóáram-kivonást végeztünk. A kapott adatsorra Boltzmann-függvénnyel illesztettünk. (G_K : adott membránpotenciálban számított K^+ konduktancia, G_{max} : a legnagyobb G_K érték, C: kontroll, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozahexaénsav.)

	$V_{1/2,i}$ tartomány (mV)	$V_{1/2,i}$ medián (mV)	N	$V_{1/2,i}$ arány (FA/K)	s_i tartomány (mV)	s_i medián (mV)	N	s_i arány (FA/K)
C_{SA}	-69,32 – -42,25	-56,13	16		-8,79 – -3,57	-5,84	16	
SA	-71,49 – -47,19	-57,58	18	$1,08 \pm 0,05$	-8,64 – -3,24	-6,05	18	$0,96 \pm 0,09$
C_{OA}	-67,19 – -52,03	-64,62	6		-8,03 – -1,81	-5,21	6	
OA	-64,44 – -49,57	-61,50	7	$0,95 \pm 0,07$	-9,45 – -5,02	-5,91	8	$1,05 \pm 0,12$
C_{LA}	-67,19 – -46,96	-58,61	6		-6,25 – -5,48	-6,07	6	
LA	-68,46 – -52,58	-60,11	7	$0,98 \pm 0,01$	-12,51 – -2,69	-4,79	7	$1,09 \pm 0,08$
C_{AA}	-60,74 – -48,82	-54,44	6		-6,50 – -5,05	-5,47	5	
AA	-63,45 – -50,67	-58,51	5	$1,06 \pm 0,01$	-8,27 – -3,89	-6,95	4	$1,05 \pm 0,04$
C_{DHA}	-64,58 – -32,49	-52,90	9		-6,84 – -3,80	-4,89	6	
DHA	-61,64 – -48,07	-54,64	6	$1,07 \pm 0,12$	-9,72 – -5,06	-5,12	5	$0,91 \pm 0,07$

5. táblázat. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése középpontjának ($V_{1/2,i}$) és meredekségének (s_i) tartományai, mediánjai és kezelt/kontroll arányai

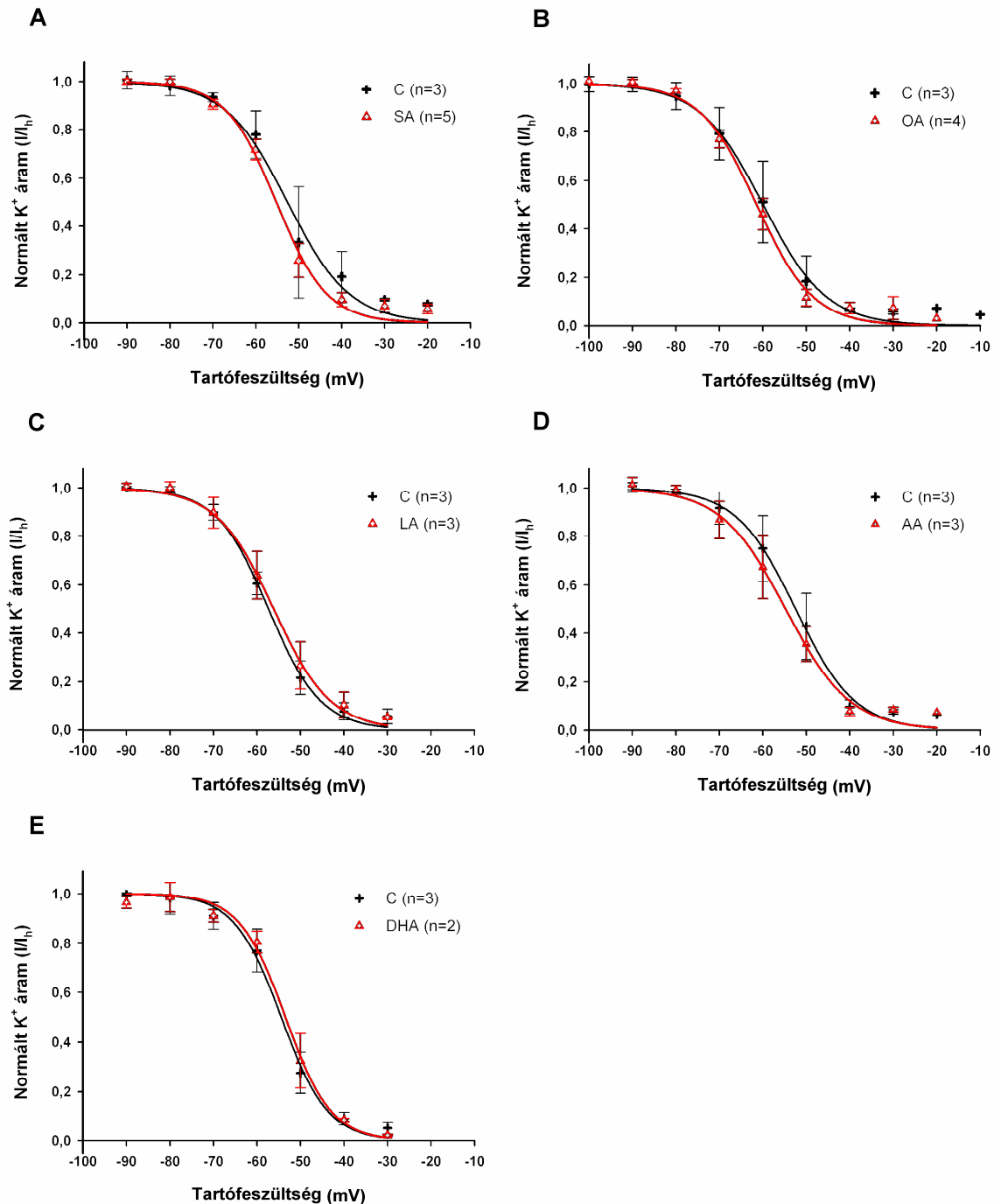
Az arányokat legalább 3 független kísérlet eredményeképpen kapott átlag $\pm$ SEM értékeként adjuk meg. (N: a tanulmányozott sejtek száma, FA: zsírsav, C: a zsírsavkezelések kontrolljai, a megfelelő zsírsavat alsó indexben tüntettük fel, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozahexaénsav.)

5.2. Adenozin-analógok dózisfüggően módosítják a DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek K⁺ csatornáinak működését

5.2.1. A DDT₁ MF-2 sejteken található ionáramok azonosítása

A DDT₁ MF-2 sejteken kétfajta feszültségfüggő áram mérhető: kifelé irányuló K⁺ áram és befelé folyó Na⁺ áram. -120 mV tartófeszültségről -80 és +90 mV között depolarizálva a sejteket a Na⁺ csatornák aktivációs küszöbe -30 mV és -40 mV között volt, a K⁺ csatornák aktivációs küszöbe pedig -20 mV volt. A Na⁺ csatornák aktivációs és inaktivációs kinetikája nagyon gyors volt, az áram 1 ms alatt teljesen aktiválódott és 6 ms alatt teljesen inaktiválódott, míg a K⁺ áram 80 ms alatt teljesen aktiválódott, és 2 s alatt sem inaktiválódott teljesen. Mivel a Na⁺ áram hamarabb aktiválódik, és inaktiválódik is, mint ahogy a K⁺ áram aktiválódik, ezért a kétfajta áramkomponens külön-külön, egymástól függetlenül mérhető.

Annak igazolására, hogy valóban K⁺ áramokat mérünk, először jól ismert K⁺ csatornagátlószereket adtunk a sejtekhez. 5 mM 4-AP és 10 mM TEA⁺ reverzibilisen blokkolták a



11. ábra. A zsírsavakkal történt kezelés nem befolyásolta a HPL-k K^+ csatornáinak egyensúlyi inaktivációját (reprezentatív görbék)

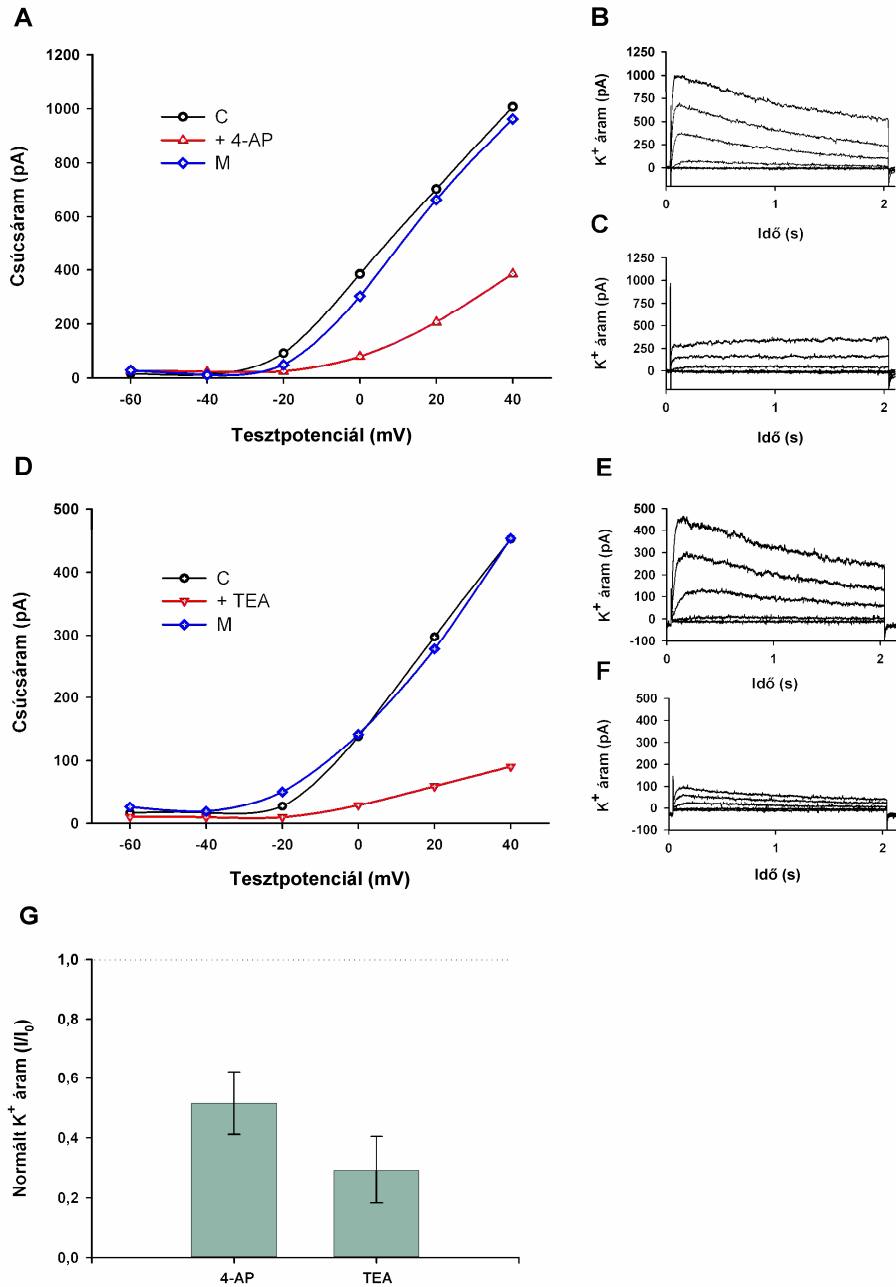
A HPL-kat az adott zsírsavat (50 μ M) tartalmazó, illetve kontroll tápoldatban 3 napig tenyésztettük, és PHA-val, valamint IL-2-vel stimuláltuk. A sejtmembránt +50 mV-ra depolarizáltuk, és a depolarizáló impulzusok között a membránpotenciált –100 és –20 mV között változtattuk 10 mV lépésközzel, egyenként 2,5 perc időtartamig. Utólagos szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. A kapott pontsorra Boltzmann-függvénnyel illesztettünk. (I: az aktuális tartófeszültségről történő depolarizáció során mért csúcsáram, I_h : a –120 mV tartófeszültségről történő depolarizáció során mért csúcsáram, C: kontroll, PA: palmitinsav, SA: sztearinsav, OA: olajsav, LA: linolsav, AA: arachidonsav, DHA: dokozahexaénsav.)

kifelé folyó teljessejt-áramot, a gátlószerek jelenlétében és a kontroll körülmények között mért áramamplitúdók hányadosa (I/I_0 , megmaradó áramhányad, MÁH) rendre $0,52 \pm 0,10$ ($N=5$), illetve $0,29 \pm 0,11$ ($N=3$) volt. A reprezentatív áramgörbéket és a K^+ csatornagátló szereket a DDT₁ MF-2 sejtek K^+ áramára kifejtett hatásait tartalmazó diagramot a 12. ábrán mutatjuk. A csatornák peptid típusú gátlószerek (ChTx, MgTx) alkalmazásával végzett farmakológiai analízisét Rubovszky Bálint Ph.D. értekezésében már bemutatta [Bálint PhD]. A kapott jellemzők a K_v1.3 csatornák tulajdonságainak felelnek meg.

5.2.2. Adenozin-agonisták és -antagonisták módosítják a DDT₁ MF-2 sejteken mérhető K^+ áramokat

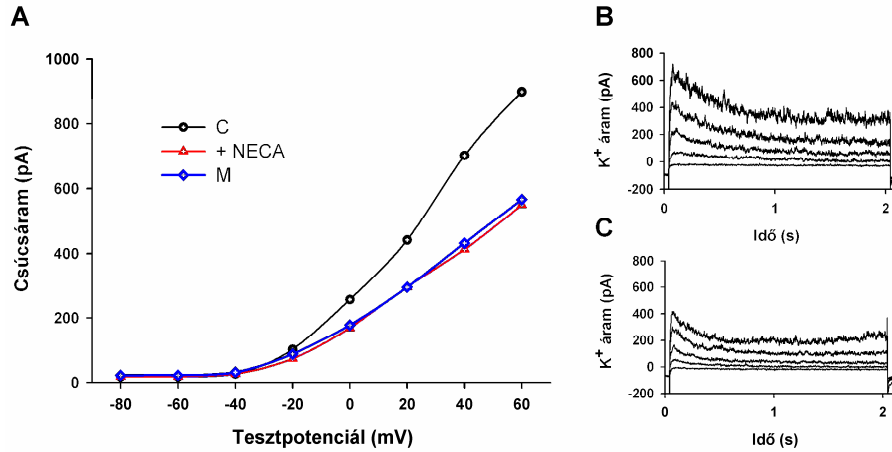
Az A₁ és A₂ adenozinreceptor-agonista hatással egyaránt rendelkező NECA 1 nM – 60 μ M koncentráció-tartományban irreverzibilisen és a koncentrációtól függő módon csökkentette a K^+ áramot a DDT₁ MF-2 sejteken (13. és 14. ábra). A félhatásos dózis (EC₅₀) 165,13 μ M-nek, a Hill-koefficiens (n_H) 0,38-nak adódott. A gátlás erősségének koncentráció-függésében maximumot tapasztaltunk; a NECA a legnagyobb gátló hatást kísérleteinkben 5 μ M koncentrációnál érte el, itt a MÁH $0,65 \pm 0,02$ -nak adódott ($N=3$) (14. ábra B panel). Mivel a NECA mind az A₁, mind az A₂ receptoroknak agonistája, alkalmazása során összetett, kétfázisú folyamat játszódhat le. Kisebb koncentrációk esetében a K^+ áram gátlása tapasztalható (A_{2a} hatás), míg nagyobb koncentrációk esetében az áram gátlását felülmúlhatja az áram növelése (A₁ hatás). A reprezentatív áramgörbék a 13. ábrán láthatók. Méréseink szerint a NECA megváltoztatja az áram kinetikáját is: gyorsabb aktivációt eredményez; pl. 5 μ M koncentráció esetében az aktivációs időállandók hányadosa (τ/τ_0) $0,70 \pm 0,10$ volt ($N=5$).

Megvizsgáltuk a NECA és a TEA⁺ együttes hatását oly módon, hogy előbb 0,5 μ M NECA-val, majd 10 mM TEA⁺-val blokkoltuk az áramot ugyanazon a sejten ($N=2$) (15. ábra). Várakozásunknak megfelelően a két molekula gátló hatása nem volt kompetitív, mivel a két anyag nem ugyanarra a helyre kötődik: a TEA⁺ közvetlenül a K^+ csatornára fejt ki hatását, míg a NECA adenozin-receptoron keresztül hat. A NECA-val blokkolt áramot a TEA⁺ tovább csökkentette, a MÁH ebben az esetben $0,27 \pm 0,05$ -nek adódott (ez jó egyezésben van azzal, amikor a TEA⁺-t önmagában használtuk, ahol a MÁH $0,29 \pm 0,11$ volt).

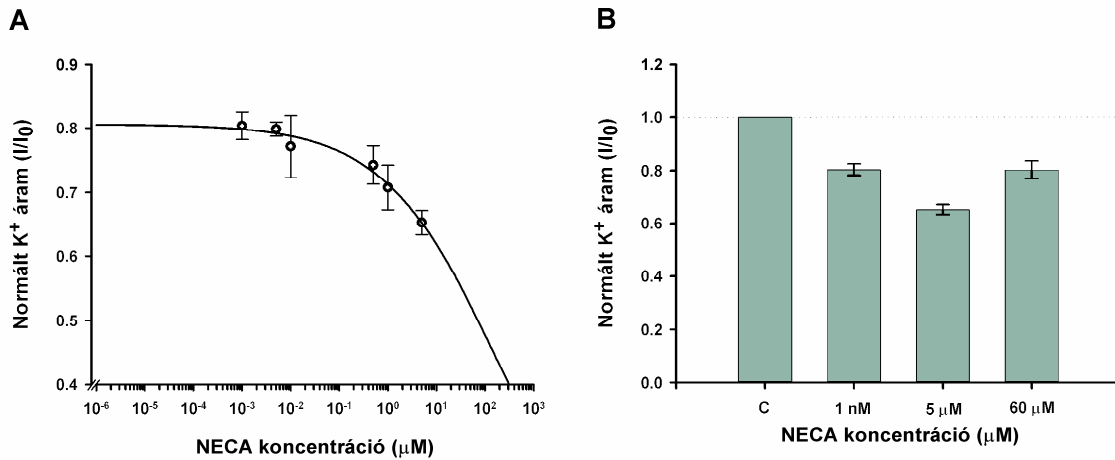


12. ábra. K⁺ csatorna-blokkolók hatása DDT₁ MF-2 sejtek K⁺ áramaira

A) 5 mM 4-AP hatására bekövetkezett változás a csúcsáramokban különböző membránpotenciálokon. **B)** A kezelés előtt mért K⁺ áram. **C)** A 4-AP kezelés után mért K⁺ áram (representatív görbék). **D)** 10 mM TEA⁺ hatására bekövetkezett változás a csúcsáramokban különböző membránpotenciálokon. **E)** A kezelés előtt mért K⁺ áram. **F)** A TEA⁺ kezelés után mért K⁺ áram (representatív görbék). Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), 2 perccel a kezelések megindítása után (4-AP ill. TEA), illetve a gátlószer kimosását követő 2 percmúlva (M) történt. 2 s-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk 20 s-on-ként -80 és +60 mV között 20 mV lépcsőközökkel -120 mV tartófeszültségről. A szivárgóáramok levonását utólagosan elvégeztük. **G)** Az egyes csatornablokkolók hatására kialakult megmaradó áramhányadok. A feltüntetett adatok a kontroll értékekre normált átlag ± SEM értékek (4-AP: N=5, TEA⁺: N=3). (I: a kezelést követően mért csúcsáram, I₀: a kezelés előtti csúcsáram.)

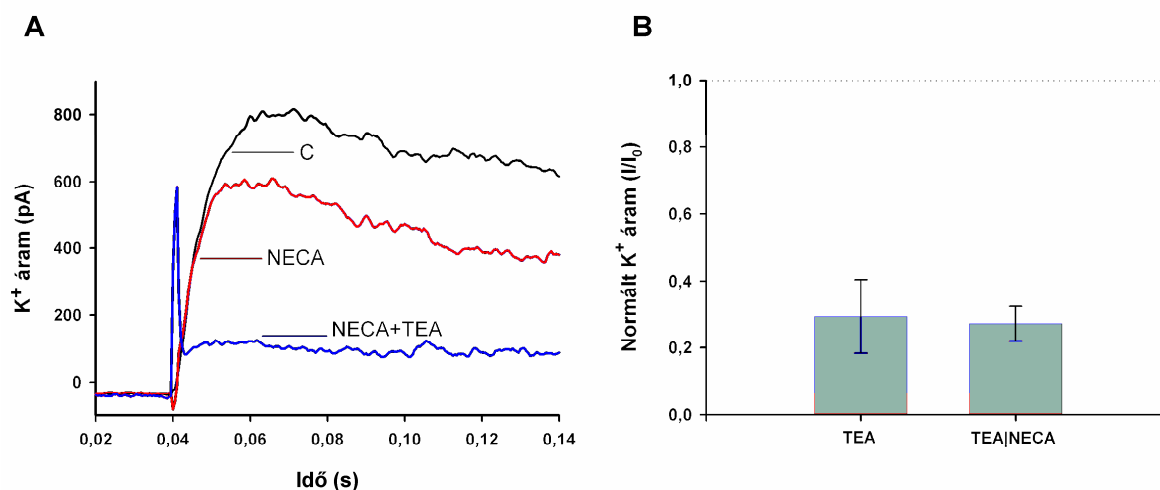


13. ábra. DDT₁ MF-2 sejt K⁺ áramának változása NECA hatására (reprezentatív görbék)
A) 0,5 μ M NECA irreverzibilisen csökkentette a sejtek K⁺ áramát. **B)** A kezelés előtt mért K⁺ áram. **C)** A kezelés után mért K⁺ áram. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), 2 perccel a kezelés megindítása után (NECA), illetve a gátlószer kimosását követő 2 perc múlva (M) történt. -120 mV tartófeszültségről 2 s-ig depolarizáltunk -80 és +60 mV között 20 mV lépcsőközönként növekvő feszültségekre, az egyes depolarizáló impulzusokat 20 s-on-ként alkalmaztuk. A szívárgóáramok levonását elvégeztük.



14. ábra. A NECA K⁺ áramra kifejtett hatása koncentrációfüggő a DDT₁ MF-2 sejtvonalon

A NECA 1 nM – 60 μ M koncentráció-tartományban csökkentette a K⁺ áramok mértékét. **A)** A K⁺ áram csökkenése kisebb NECA koncentrációk esetén. A görbét a Hill-egyenlettel illesztettük ($a=0,725$; $EC_{50}=165,13 \mu$ M; $n_H=0,38$; $y_0=0,08$). **B)** A gátlóerősség koncentráció-függésében a NECA összetett hatása miatt maximumot tapasztaltunk, amely 5 μ M-nál jelentkezett (N=3-6). A sejteket 2 s-ig depolarizáltuk -120 mV tartófeszültségről -80 és +60 mV közötti, 20 mV-onként növekvő feszültségekre. A depolarizáló impulzusokat 20 s-onként alkalmaztuk. Utólagos szívárgóáram-kivonást végeztünk. A csúcsáramokat a +60 mV-ra történő depolarizáció során kapott görbékből határoztuk meg. A kontroll értékekre normált áramok átlagait $\pm$ SEM ábrázoltuk. (I: a kezelést követően mért csúcsáram, I₀: a kezelés előtti csúcsáram.)

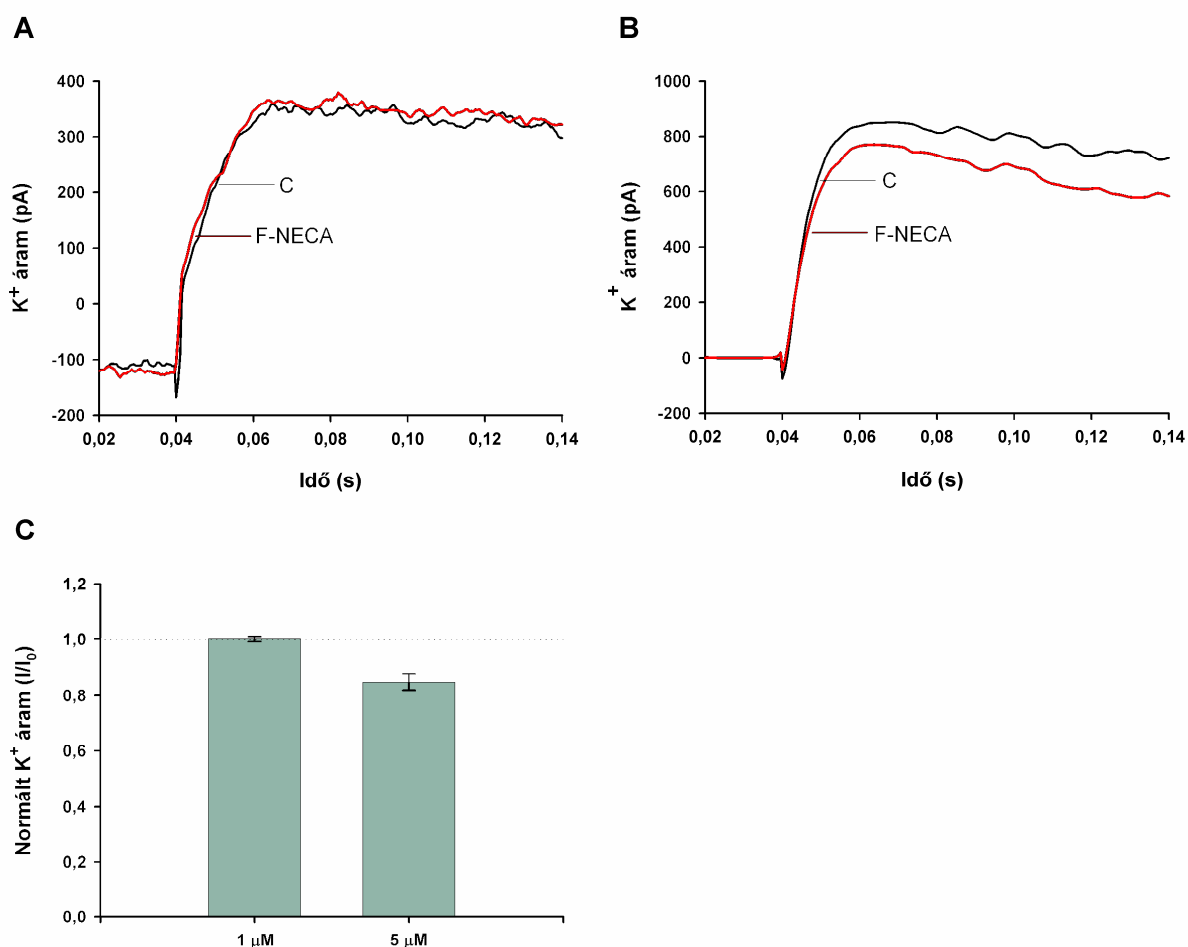


15. ábra. A NECA és a TEA⁺ hatása nem kompetitív DDT₁ MF-2 sejteken

A) Először a 0,5 μ M NECA-t, azután a 10 mM TEA⁺-t adtuk a sejtekhez. A TEA⁺ a NECA-val csökkentett áramot tovább csökkentette. A sejtet -120 mV tartófeszültségről 20 s-onként depolarizáltuk 2 s-ig tartó, -80 és $+60$ mV közötti, 20 mV-onként növekvő feszültségekre. A szivárgóáram-kivonást elvégeztük. Az ábrán a $+60$ mV-ra történő depolarizációval előállított görbéket mutatjuk. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), illetve 2 perccel a kezelések megindítása után (NECA ill. TEA⁺) történt. **B)** A TEA⁺ önmagában ugyanolyan mértékben csökkentette a K⁺ áramot, mint a NECA-val történt kezelést követő TEA⁺ alkalmazás. A feltüntetett megmaradó áramhányadok az önálló TEA⁺ kezelés esetében a kontroll értékekre normált adatok átlaga $\pm$ SEM (N=3), a NECA-kezelést követő TEA⁺ alkalmazás esetében a NECA-val csökkentett áramértékekre normált adatok átlaga $\pm$ SEM (N=2). A csúcsáramokat a $+60$ mV-ra történő depolarizáció során kapott görbékből határoztuk meg. (I: a kezelést követően mért csúcsáram, I₀: a kezelés előtt mért csúcsáram.)

A NECA analógja, a ^{18}F -NECA β^+ bomló izotópként viselkedik, az élő szervezetbe bevihető, így pozitron-emissziós tomográfiás (PET) képalkotás segítségével diagnosztikai célokra (az egyes adozinreceptor-típusok szervezeten belüli eloszlásának feltérképezésére, kinetikai sajátosságai vizsgálatára) felhasználható. Hogy elkerüljük a β^+ sugárzó anyaggal történő érintkezést, *patch-clamp*-es kísérleteinkben ezen anyagnak a nem radioaktív izotópját, a ^{19}F -NECA-t használtuk.

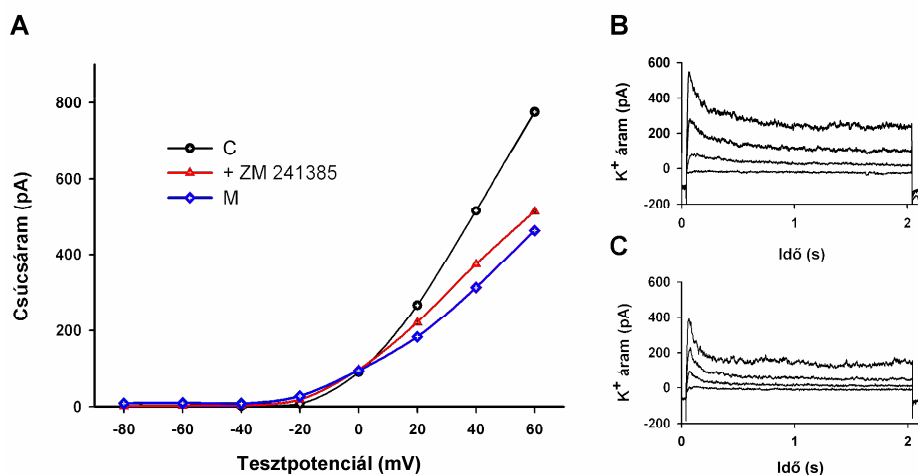
A ^{19}F -NECA 1 μ M koncentrációban nem fejtett ki hatást a K⁺ áramok amplitúdójára (MÁH: $1,00 \pm 0,01$; N=2), sem aktivációs időállandójára (τ/τ_0 : $0,98 \pm 0,04$). 5 μ M koncentráció esetében azonban már tapasztaltunk gátló hatást, a MÁH értéke ebben az esetben $0,85 \pm 0,03$ volt (N=3) (16. ábra). Az aktivációs időállandóra az F-NECA ebben a koncentrációban sem volt hatással: az aktivációs időállandók hányadosa $0,99 \pm 0,05$ volt (N=4).



16. ábra. ¹⁹F-NECA hatása DDT₁ MF-2 sejt K⁺ áramára

A) A csúcsáram értékét 1 μM ¹⁹F-NECA nem változtatta meg. **B)** A csúcsáram értéke kismértékben csökkent 5 μM ¹⁹F-NECA hatására (reprezentatív görbék). Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), illetve 2 perccel a kezelés megindítása után (F-NECA) történt. -120 mV tartófeszültségről 2 s-ig depolarizáltunk -80 és +60 mV között 20 mV lépcsőközönként növekvő feszültségekre, az egyes depolarizáló impulzusokat 20 s-on-ként alkalmaztuk. A szivárgóáramok kivonását utólagosan elvégeztük. Az ábrán a +60 mV-ra történő depolarizáció során kapott áramgörbéket mutatjuk be. **C)** 1 μM és 5 μM koncentrációban alkalmazott ¹⁹F-NECA-nak a DDT₁ MF-2 sejtek K⁺ áramára kifejtett hatása. A csúcsáramokat a -120 mV tartófeszültségről +60 mV-ra történő depolarizáció során kapott görbékéből határoztuk meg. A feltüntetett adatok a kontroll értékekre normált átlag ± SEM értékek (1 μM: N=2, 5 μM: N=3). (I: a kezelést követően mért csúcsáram, I₀: a kezelés előtt mért csúcsáram.)

Az A_{2a} adenosinreceptor-antagonista ZM 241385 1 μM koncentrációban az áram csökkenését idézte elő, MÁH: 0,81±0,07(N=4), mely hatás irreverzibilis volt, a sejtek normál külső oldattal történő mosása nem függesztette fel a ZM 241385 hatását. A reprezentatív áramgörbék a 17. ábrán láthatók. A ZM 241385 ebben a koncentrációban a K⁺ áram aktivációs időállandójára nem volt hatással (τ/τ₀: 0,95±0,09; N=4).

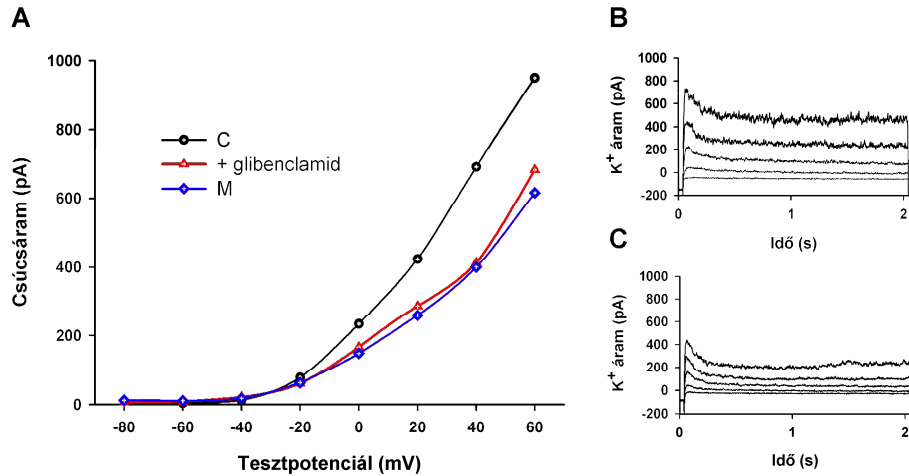


17. ábra. ZM 241385 hatása a DDT₁ MF-2 sejt K⁺ áramára (representatív görbék)

A) 1 μ M ZM 241385 irreverzibilisen csökkentette a sejtek K⁺ áramát. **B)** A kezelés előtt mért K⁺ áram. **C)** A kezelés után mért K⁺ áram. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), 2 perccel a kezelés megindítása után (ZM 241385), illetve a gátlószer kimosását követő 2 perc múlva (M) történt. 2 s-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk 20 s-on-ként -80 és +60 mV között 20 mV lépcsőközőkkel, -120 mV tartófeszültségről. A szivárgóáramok utólagos kivonását elvégeztük.

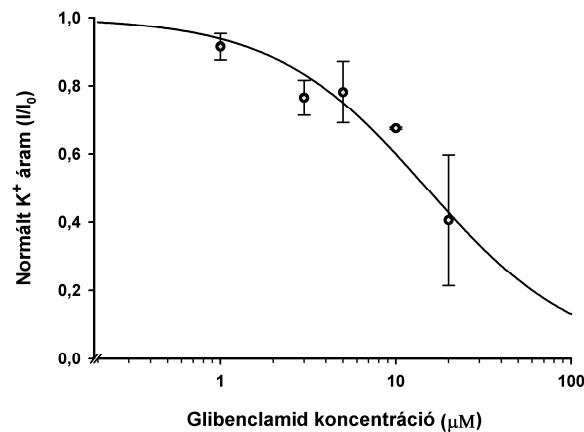
A K_{ATP} csatorna-blokkoló glibenclamid 1–20 μ M koncentráció-tartományban irreverzibilisen és koncentrációfüggő módon csökkentette a K⁺ áramot, 3 μ M-nél a MÁH $0,77 \pm 0,05$ volt (N=3). A félhatásos dózis (EC₅₀) 15,00 μ M-nek, a Hill-koefficiens (n_H) 1-nek adódott. A reprezentatív áramgörbék a 18. ábrán, a koncentrációfüggést bemutató görbe a 19. ábrán láthatók. A glibenclamid az áram kinetikai paramétereire nem volt hatással: a kezelt/kontroll arány az aktivációs időállandó esetében $1,08 \pm 0,18$ -nak adódott 3 μ M koncentrációnál.

A 20. ábra mutatja a különböző ligandumoknak a DDT₁ MF-2 sejtek K⁺ áramára kifejtett hatásait tartalmazó összesített diagramot, a 21. ábra pedig az aktivációs időállandókra kifejtett hatásait tartalmazó összesített diagramot és a reprezentatív áramgörbéket.



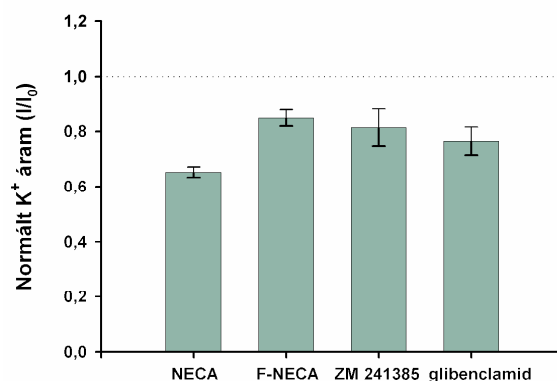
18. ábra. DDT₁ MF-2 sejt K⁺ áramának változása glibenclamid hatására (reprezentatív görbék)

A) 3 μ M glibenclamid lecsökkentette a DDT₁ MF-2 sejtek K⁺ áramát. **B)** A kezelés előtt mért K⁺ áram. **C)** A kezelés után mért K⁺ áram. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), 2 perccel a kezelés megindítása után (glibenclamid), illetve a gátlószer kimosását követő 2 perc múlva (M) történt. -120 mV tartófeszültségről 2 s-ig depolarizáltunk -80 és +60 mV között 20 mV lépcsőközönként növekvő feszültségekre, az egyes depolarizáló impulzusokat 20 s-on-ként alkalmaztuk. Utólagos szivárgóáram-kivonást végeztünk.



19. ábra. A glibenclamid hatása koncentrációfüggő a DDT₁ MF-2 sejtvonalon

A glibenclamid 1–20 μ M koncentráció-tartományban csökkentette a K⁺ áramok mértékét. A csúcsáramokat a -120 mV tartófeszültségről +60 mV-ra történő, 2 s-ig tartó depolarizációval kapott görbékből határoztuk meg. A feltüntetett adatok a kontroll értékekre normált áramok átlagai $\pm$ SEM értékek (N=2-3). (I: a kezelést követően mért csúcsáram, I₀: a kezelés előtt mért csúcsáram.) A görbét a Hill-egyenlettel illesztettük (EC₅₀=15,00 μ M; n_H=1; a=1; y₀=0).

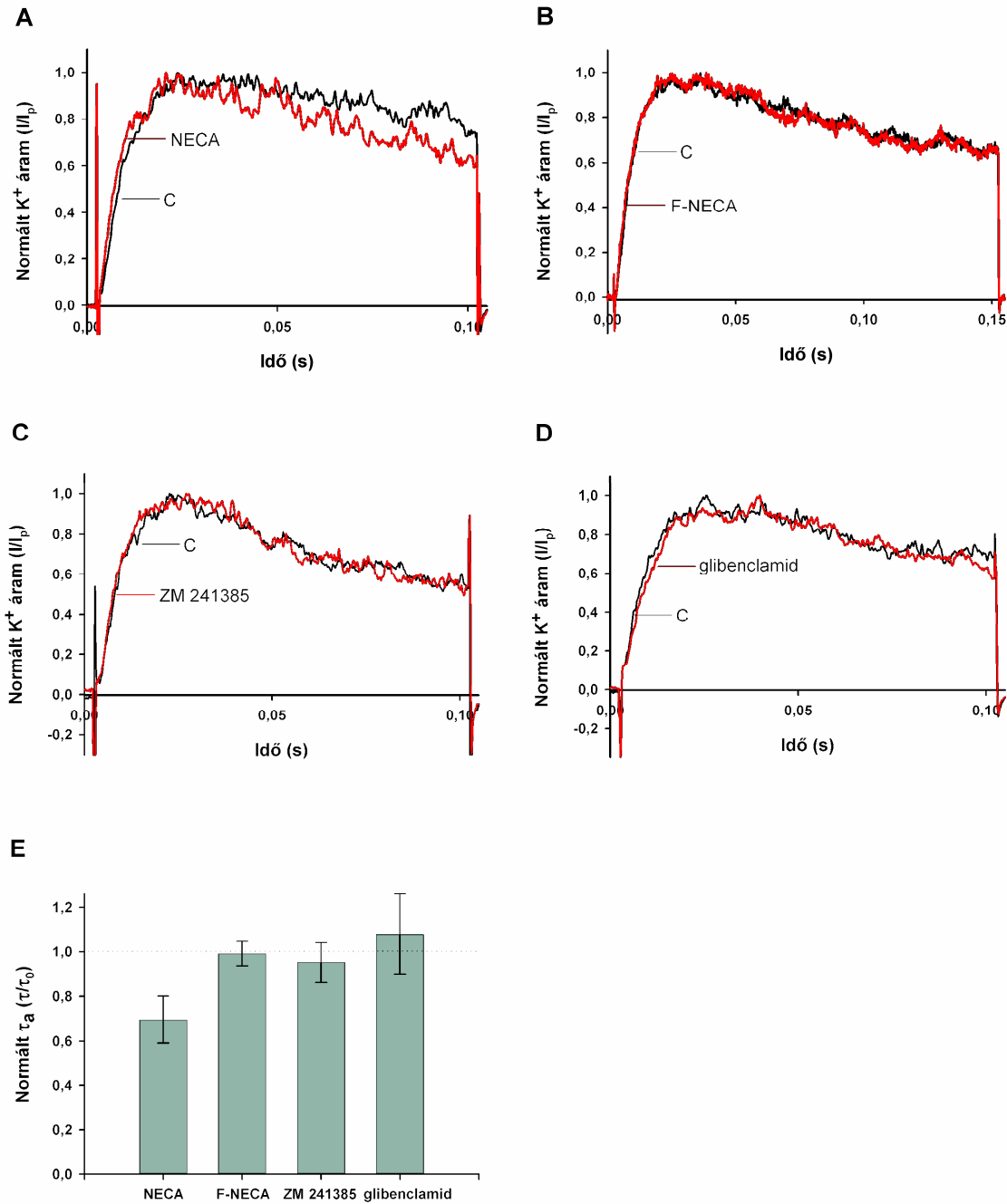


20. ábra. Adenozin-receptor-ligandumok hatása a DDT₁ MF-2 sejt vonal K⁺ áramára
A K⁺ áram amplitúdójában bekövetkező változások 5 μM NECA, 5 μM ¹⁹F-NECA, 1 μM ZM 241385 és 3 μM glibenclamid hatására. A csúcsáramokat a –120 mV tartófeszültségről +60 mV-ra történő depolarizáció során kapott görbékkel határoztuk meg. A feltüntetett adatok a kontroll értékekre normált átlag ± SEM értékek (NECA: N=3, ¹⁹F-NECA: N=3, ZM 241385: N=4, glibenclamid: N=3). (I: a kezelést követően mért csúcsáram, I₀: a kezelés előtt mért csúcsáram.)

5.2.3. Adenozinreceptor-aktiváció vagy –inaktiváció nem befolyásolja a Na⁺ áramokat a DDT₁ MF-2 sejteken

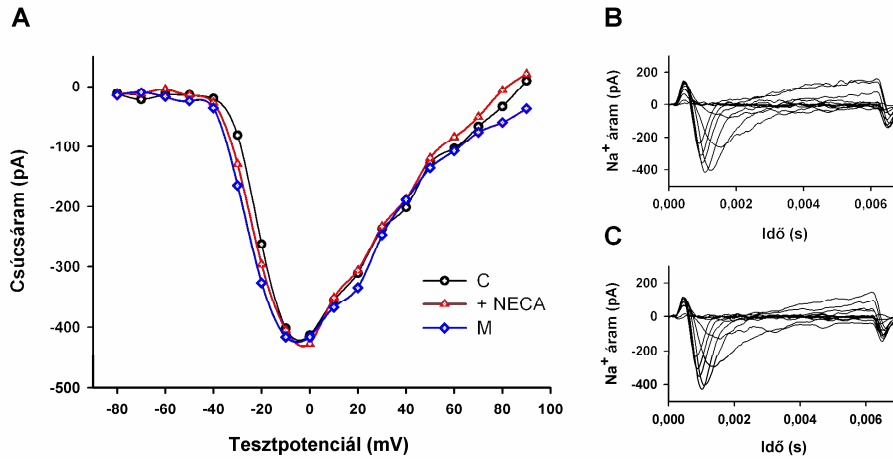
A gyors befelé folyó áramot feszültségfüggő Na⁺ áramként azonosítottuk a következő kritériumok alapján: 1. 100 nM *tetrodotoxin* (TTx) reverzibilisen blokkolta az áramot, 2. a csatorna az ingerelhető sejtek feszültségfüggő gyors Na⁺ csatornájára jellemző kinetikai paraméterekkel és feszültség–áram karakterisztikával rendelkezett, 3. Na⁺ mentes extracelluláris környezetben az áram nem volt mérhető.

A vizsgált P₁ agonisták és antagonisták a Na⁺ csatornák csúcsáramát nem befolyásolták. A mért MÁH-ok: 1 μM NECA esetén: 0,97±0,04 (N=3), 1 μM ZM 241385 esetén: 1,02±0,11 (N=4), 1 μM glibenclamid esetén pedig: 0,99±0,03 (N=3). A reprezentatív áramgörbék a 22–24. ábrákon, a különböző ligandumoknak a DDT₁ MF-2 sejtek Na⁺ áramára kifejtett hatásait tartalmazó összesített diagram a 25. ábrán látható.



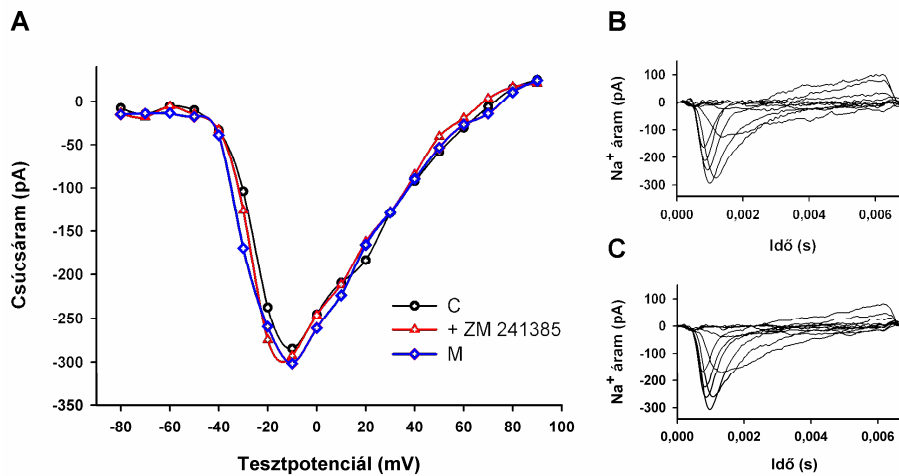
21. ábra. Adenozin-receptor-ligandumok hatása a DDT₁ MF-2 sejt vonal K^+ áramának aktivációs időállandójára

A–D) A kontroll és a kezelések után mért normált, reprezentatív áramgörbék. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), illetve 2 perccel a kezelések megindítása után történt. A sejteket -120 mV tartófeszültségről $+50$ mV-ra depolarizáltuk 100, illetve 150 ms-ig, a depolarizáló impulzusokat 30 s-onként alkalmaztuk. A mintavételi frekvencia 20 kHz, a szűrési frekvencia 5 kHz volt. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az áramgörbét a Hodgkin–Huxley modellnek megfelelően illesztettük [1. Az *adatok kiértékelése* c. részt, (1) egyenlet]. **E)** A DDT₁ MF-2 sejtek K^+ áramának aktivációs időállandójában bekövetkező változások. A kontroll sejteken mért értékekre normált adatokat ábrázoltuk. (I : t időpillanatban mért áram értéke, I_p : csúcsáram, τ : a kezelés után kapott aktivációs időállandó, τ_0 : a kezelés előtti inaktivációs időállandó.)



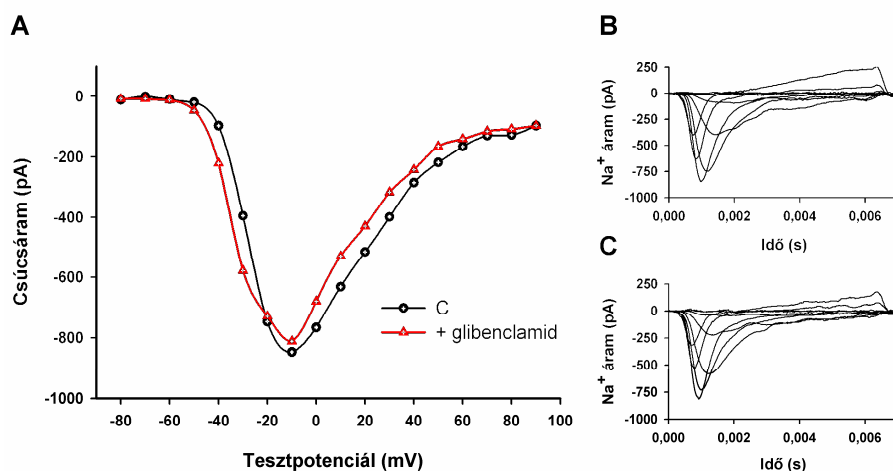
22. ábra. NECA hatása a DDT₁ MF-2 sejtek Na⁺ áramára (reprezentatív görbék)

A) 1 μ M NECA nem változtatta meg a DDT₁ MF-2 sejtek Na⁺ csúcsáramát. **B)** A kezelés előtt mért Na⁺ áram. **C)** A kezelés után mért Na⁺ áram. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), 2 perccel a kezelés megindítása után (NECA), illetve a gátlószer kimosását követő 2 perc múlva (M) történt. Az áramgörbék felvételéhez 6 ms-ig depolarizáltunk -120 mV tartófeszültségről -80 és +90 mV között 10 mV-os lépcsőközökkel, az egyes depolarizáló impulzusokat 1,5 s-onként alkalmaztuk. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az ábrán a jó áttekinthetőség kedvéért a nagyobb depolarizációnál kapott görbéket nem tüntettük fel.



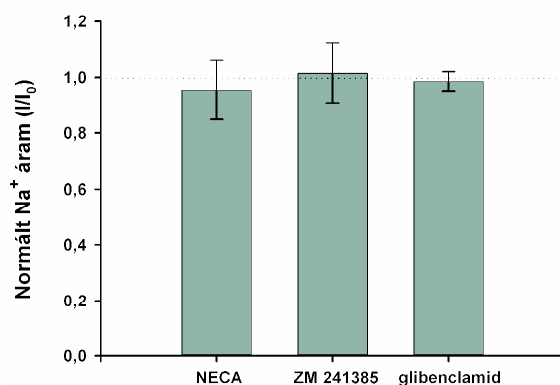
23. ábra. ZM 241385 hatása a DDT₁ MF-2 sejtek Na⁺ áramára (reprezentatív görbék)

A) 1 μ M ZM 241385 nem befolyásolta a DDT₁ MF-2 sejteken mérhető Na⁺ csúcsáramot. **B)** A kezelés előtt mért Na⁺ áram. **C)** A kezelés után mért Na⁺ áram. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), 2 perccel a kezelés megindítása után (ZM 241385), illetve a gátlószer kimosását követő 2 perc múlva (M) történt. -120 mV tartófeszültségről 1,5 s-onként depolarizáltunk -80 és +90 mV között 10 mV-os lépcsőközökkel, 6 ms időtartamig. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. A jó áttekinthetőség kedvéért az ábrán a nagyobb depolarizációnál kapott görbéket nem tüntettük fel.



24. ábra. Glibenclamid hatása a DDT₁ MF-2 sejtvonalon mért Na⁺ áramra (representatív görbék)

A) 3 μ M glibenclamid hozzáadása során a Na⁺ csúcsáram nem változott. **B)** A kezelés előtt mért Na⁺ áram. **C)** A kezelés után mért Na⁺ áram. Az áramok mérése kontroll körülmények között (C), 2 perccel a kezelés megindítása után (glibenclamid), illetve a gátlószer kimosását követő 2 perc múlva (M) történt. 6 ms-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk 1,5 s-onként -80 és +90 mV között 10 mV-os lépcsőközökkel, -120 mV tartófeszültségről. *Online* szívárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az ábrán a jó áttekinthetőség kedvéért a nagyobb depolarizációnál kapott görbéket nem tüntettük fel.



25. ábra. A Na⁺ áram amplitúdójában egyes adenzin-receptor-ligandumok hatására bekövetkező változások a DDT₁ MF-2 sejtvonalon

A Na⁺ áram nem változott meg 1 μ M NECA, 1 μ M ZM 241385, valamint 3 μ M glibenclamid hatására. A csúcsáramokat a 6 ms-ig tartó, -120 mV tartófeszültségről -10 mV-ra történő depolarizáció során kapott görbékből határoztuk meg. A feltüntetett adatok a kontroll értékekre normált átlag $\pm$ SEM értékek (NECA: N=3, ZM 241385: N=4, glibenclamid: N=3). (I: a kezelést követően mért csúcsáram, I₀: a kezelés előtt mért csúcsáram.)

6. DISZKUSSZIÓ

6.1. A citoplazma-membrán foszfolipid-összetételének hatása a $K_v1.3$ csatornák funkciójára humán limfocitákban

Jelen tanulmányban különböző zsírsavaknak a $K_v1.3$ csatornák kapuzási paramétereire kifejtett hatását vizsgáltuk PHA-val és IL-2-vel stimulált HPL-kon. A mitogén PHA és a T sejt autokrin növekedési faktor IL-2 hozzáadása magas szintre emelte a $K_v1.3$ csatornák expresszióját a HPL membránban [1], ami lehetővé tette a kapuzási paraméterek pontosabb meghatározását, és minimálisra csökkentette a $K_v1.3$ -on kívüli egyéb csatornák hozzájárulását a teljes sejt-áramhoz. A $K_{Ca}3.1$ -nek, a HPL-k Ca^{2+} aktivált K^+ csatornájának aktivitását EGTA-val puffertelt / Ca^{2+} mentes pipettatólító oldattal gátoltuk [266]. Így biztosak lehetünk abban, hogy a disszertációban bemutatott adatok a $K_v1.3$ csatornák tulajdonságainak a különböző lánchosszúságú és telítettségű zsírsavakkal történő kezelések eredményeképpen kialakult változásairól számolnak be. A zsírsavak HPL membránba történő beépülésének hatékonyságát gázkromatográfiás mérésekkel erősítettük meg; minden egyes kezelés specifikusan megnövelte a megfelelő zsírsavnak a teljes zsírsavmennyiséghez viszonyított relatív mennyiségét a HPL-k plazmamembránjában.

A zsírsavak $K_v1.3$ csatornák aktivitására kifejtett hatásának tanulmányozására az alábbi irodalmi adatok készítettek bennünket: 1. a $K_v1.3$ csatornák aktivitása alapvetően meghatározza a limfocita-aktivációs folyamatokat; 2. a limfocitamembrán lipidösszetételében bekövetkező változások drámaian befolyásolnak bizonyos immunreakciókat; 3. a membránban lévő lipidkörnyezet módosítja általában a membránfehérjék, és különösképpen az ioncsatornák funkcióját.

A limfocitákban lejátszódó jelátviteli folyamatok során szabályozó szereppel bíró legfontosabb K^+ csatornák a *Shaker* családba tartozó feszültségkapuzott $K_v1.3$ és a közepes vezetőképességű $K_{Ca}3.1$ [3, 12]. Ezeknek a K^+ csatornáknak az aktivitása meghatározza a T sejtek nyugalmi potenciálját: $\approx(-60)-(-70)$ mV-ra állítja be azt. A negatív membránpotenciál fenntartása szükséges a Ca^{2+} -nak a sejtekbe történő belépéséhez elegendő elektrokémiai hajtóerő biztosításához a hosszan tartó Ca^{2+} jel alatt. A T sejtek antigén-aktivációjának membránpotenciál-függése jól ismert; a $K_v1.3$ gátlószerei depolarizálják a T sejteket, *in vivo* és *in vitro* egyaránt gátolják a T sejt-proliferációt és a Ca^{2+} jelátvitelt [91, 92]. A $K_v1.3$

csatornák száma a nyugvó T sejtekben mérsékelt, $\approx 300\text{--}400$ csatorna/sejt, [14, 267], míg az $K_{Ca}3.1$ expressziója elhanyagolható, $\approx 10\text{--}30$ csatorna/sejt [266]. Tekintettel arra, hogy a $K_V1.3$ csatornák nagyon szűk membránpotenciál-tartományban működnek egyensúlyban (azaz az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggésének metszetében), ezeknek a paramétereknek a feszültségfüggésében bekövetkező bármilyen kis változás nagymértékben befolyásolhatja a K^+ áram alkalmasságát a T sejtek membránpotenciáljának irányítására [190]. Mivel a T sejt-membrán bemeneti ellenállása szélsőségesen nagy, a kísérletek és az elméleti megfontolások előrevetítik, hogy néhány $K_V1.3$ csatorna aktivitása elegendő egy T sejt membránpotenciáljának a K^+ egyensúlyi potenciálja közelébe történő beállításához, és ezek az előrejelzések tökéletesen összhangban vannak a $K_V1.3$ nagyon alacsony egyensúlyi nyitási valószínűségével [5, 87]. A fentiekből következik, hogy a $K_V1.3$ kapuzás kinetikájában bekövetkező változások, különösen azok, amelyek a vezető (nyitott) állapotban eltöltött időt befolyásolják, nagyon hatékonyan megváltoztathatják a K^+ konduktancia hozzájárulását a teljes membrán-konduktanciához, és így módosíthatják a T sejtek membránpotenciálját. Például az ebben az értekezésben leírt PUFA kezelést követő, az inaktivációs kinetikában bekövetkező kb. kétszeres gyorsulás nagyon hatékonyan lecsökkenti a nyitott állapot élettartamát. A megnövekedett inaktivációs sebesség hatását az áram PUFA kezelést követő gyorsabb nyitási kinetikája alig kompenzálja, mivel az inaktivációs kinetika kb. 2 nagyságrenddel lassabb, mint az aktivációs kinetika, ezért az $I(t)$ görbe alatti terület (pl. az átvitt töltés mennyisége) érzékenyebb az inaktivációs kinetikában bekövetkező változásokra, mint az aktivációs kinetikában bekövetkezőkre. Így az aktivációs és az inaktivációs kinetikák összesített hatása egy csökkent membrán K^+ vezetőképesség, ami megmagyarázhatja a PUFA-k immun- és autoimmun folyamatok szuppressziójában kifejtett jótékony hatását (lásd alább). Ezt az elképzelést alátámasztja a $K_V1.3$ csatornák T sejt-altípus-specifikus expressziója is: az effektor memória T sejtek – amelyek a közvetlen szöveti károsodásokért felelősek az autoimmun megbetegedések során – proliferációja kizárólag a $K_V1.3$ aktivitására érzékenyek, mivel ezek a sejtek magas $K_V1.3$ és alacsony $K_{Ca}3.1$ expressziójú csatorna-fenotípusba tartoznak [268].

Tanulmányunk arról tanúskodik, hogy minden vizsgált PUFA (LA, AA és DHA) befolyásolja a HPL-k $K_V1.3$ csatornáinak aktivációs és inaktivációs kinetikáját, ugyanakkor az egyszerűen telítetlen OA és az telített zsírsavak (PA és SA) hatástalanok. Ez a tapasztalat párhuzamba állítja a zsírsavak hatékonyságát a limfocita-aktivációs folyamatok gátlásával. Számos tanulmány rámutat arra, hogy az n-3 PUFA-kban gazdag étrend gyulladásellenes és immunszuppresszív *in vivo* és *in vitro* egyaránt [25, 27, 28, 30, 32], és mind a szerzett, mind a

természetes immunitás sejtes alkotóelemeire hatással van. A limfocita-funkció szintén hatékony modulátorainak, az eikozanoidoknak a HPL membránban előforduló mennyiségét és fajtáját a táplálékkal elfogyasztott zsír típusa befolyásolhatja [28, 269]. Rotondo és mts. (1994) [28] a citokin-stimulált tímuszbeli limfocita-proliferáció C20 és C18 zsírsavak általi koncentrációfüggő gátlását fedezték fel. Ezek a szerzők úgy vélik, hogy a zsírsavak gátló hatása nem egyéb metabolitokká történő átalakulás eredménye, hanem közvetlen hatás. Van der Vusse és mts. [38] arról számoltak be, hogy az AA közvetlenül hathat az ioncsatorna-aktivitásra és a jelátvitelre, míg metabolitjai, pl. az eikozanoidok, közvetett hatásokat válthatnak ki. Devor és Frizzel [214, 220] megerősítette ezt a hipotézist K^+ csatornákon: a zsírsavak közvetlenül módosítják a csatornanyitási valószínűséget (P_O) és az átlagos zárva tartási időt.

A PUFA-khoz hasonlóan a PUFA-tartalmú triacil-glicerinek is koncentráció- és dózisfüggő módon gátolják a Con A által stimulált limfocita-proliferációt patkányban, míg az SFA-t vagy az OA-at tartalmazó triacil-glicerinek nem gátolnak [32]. A triacil-glicerineknek ezek a limfocita-funkcióra gyakorolt közvetlen hatásai megmagyarázhatják, hogy a gyulladásos betegségektől szenvedő betegek állapotában miért figyeltek meg javulást PUFA-ban gazdag étrend hatására bizonyos klinikai vizsgálatok során.

A PUFA-k hatásának molekuláris mechanizmusát illetően Stulnig és mts. (1998) [25] arról számoltak be, hogy Jurkat T sejt-lipidek PUFA-kkal történő dúsítása nagyon korai jelátviteli eseményt gátol. Úgy gondolják, hogy a T sejt-aktiváció PUFA indukált gátlása az Src kinázcsaládba tartozó Lck-nak a DRM-ek citoplazma felőli rétegéből történő kiszorításának a következménye. A mi munkánk azt mutatja, hogy az Lck kiszorítása mellett a $K_V1.3$ aktivitásának szuppressziója egy kiegészítő mechanizmus lehet az immunreakciók gátlásában.

A feszültségfüggő ioncsatornák a membránpotenciálban bekövetkező változásra válaszolva nyitnak. A nyitás és az azt követő lassú (P/C típusú) inaktivációs lépés a csatornafehérje feszültség-szenzor doménjében és pórusdoménjében végbemenő konformációs változások sorozatát foglalja magában [107]. Minthogy a K^+ csatornák a sejtmembránba ágyazódnak, funkciójukat befolyásolhatják a lipid-fehérje kölcsönhatások. Ezt alátámasztja a humán $K_V1.2$ csatorna napjainkban elvégzett röntgen-krisztallográfiás szerkezetvizsgálata, ami a csatorna különböző lehetségesen lipidek felőli felületeit mutatta meg (a $K_V1.2$ közeli rokonságban áll a $K_V1.3$ -mal) [270, 271]. A funkcionális csatorna négy alegysége mindegyikének a pórushélice és a szelektivitási filtere mentén található S5 és S6 transzmembrán hélixek együtt alkotják az egyetlen pórusdomént, míg minden egyes alegység

S1–S4 hélicei alkotják a csatorna feszültség-szenzor doménjeit (csatornánként négyet). A röntgenkristallográfiás szerkezet alapján a bizonyítékok következő sora rámutat a fehérje–lipid kölcsönhatások fontosságára [271]: 1. a kristályosodási folyamat során detergens/lipid elegy jelenlétére volt szükség; 2. a feszültség-szenzor domén nem illeszkedik szorosan a pórusdoménhez; hanem a pórus hidrofób felületeit és a feszültség-szenzorokat elválasztó teret lipidek tölthetik ki natív membránokban; 3. a feszültség-érzékelésben kulcsszerepet játszó oldalláncok (az S4 extracelluláris végétől számított Arg-1 és -2) az S4 hélix lipidborítású felszínén helyezkednek el. Ezek a szerkezeti adatok jól egyeznek a K_V AP csatornán lipid membránokban mért elektron paramágneses rezonancia adatokkal [272] és a pók toxinoknak a $K_V2.1$ csatornák feszültség-szenzorával történő kölcsönhatásával [273].

A lipidek kölcsönhatása a K^+ csatornákkal specifikus lehet, ahogy például a $K_V2.1$ csatornák esetében. Lu és mts. kimutatták, hogy a szfingomielináz D által katalizált, a lipidmolekulák fejcsoport-töltésében bekövetkező – amely molekulák közvetlenül és viszonylag specifikusan hatnak kölcsön a csatornákkal – változás eltolja a K_V csatornák G–V viszonyát negatív irányba, hatékonyan aktiválva ezzel a csatornákat negatív membránpotenciáloknál, amelyeknél egyébként praktikusán zárt állapotban maradnának [128]. A csatornáknak ezen a specifikus “lipid aktivációján” kívül a membrán lipidösszetételének számos hatását a membrán-mikroviszkózitás (fluiditás) megváltozásának [21], a membrángörbület és a laterális nyomásprofil membránban bekövetkező változásának [274] és az ioncsatornák lipid raftokba történő beépülésének vagy onnan való kirekesztésének [205] tulajdonítják.

Például a $K_V1.3$ -nak mind az aktivációs, mind az inaktivációs kinetikája lassul, amikor a membrán koleszterin-tartalma növekszik a HPL-kben, és ez a hatás párhuzamban áll a koleszterindúsítás-indukált membránmikroviszkózitás-növekedéssel [21], továbbá együtt jár az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének pozitív membránpotenciálok irányába történő eltolódásával, míg az egyensúlyi inaktiváció változatlan marad. Így a PUFA-k, amelyek növelik a membrán fluiditását (csökkentik a mikroviszkózitást), várhatóan csökkentik a K^+ áram kinetikáját jellemző időállandókat. Ez összhangban van a mi tapasztalatainkkal.

Azt az elképzelést, miszerint a PUFA-knak a $K_V1.3$ csatornákra kifejtett hatása inkább a csatorna fizikai-kémiai környezetének változásaival van összefüggésben, semmint a csatornák kapuzási szerkezetével történő specifikus kölcsönhatással, a következő okok miatt megerősítjük. 1. Minőségileg hasonló változásokat fedeztek fel a $K_V1.3$ aktivációs és inaktivációs kinetikájában a különböző lánc hosszúságú, telítettségi fokú és kettőskötés-helyzetű PUFA-kkal. 2. A PUFA-k közös jellemzője, hogy acil-láncuk a telítetlenség

mértékének növekedésével egyre hajlítotabb, és ezért változtatják meg a membrán mechanikai tulajdonságait, pl. fluiditás-növekedést (mikroviszkozitás-csökkenést) okozva [275].

Eredményeink szintén arról tanúskodnak, hogy összefüggés van a K^+ csatorna kinetikájára kifejtett hatás és az adott zsírsav telítetlenségének mértéke és/vagy lánc hossza között: az SFA-k (16:0, 18:0) és a MUFA (18:1) esetében nem mutatkozott szignifikáns hatás a csatorna kinetikában, míg a PUFA-knál (18:2, 20:4, 22:6) igen. Az OA (18:1) n-9 MUFA, a LA (18:2) és az AA (20:4) n-6, a DHA (22:6) n-3 PUFA, így az utolsó kettős kötés helye (vagyis a telített szakasz hossza a szénlánc végén) az acil-láncban fontosnak tűnik a hatás kifejtéséhez. Anel és mts. [213] kimutatták, hogy a cisz-telítetlen zsírsavak megváltoztatják a lipid-acilláncok sorrendjét és gátolják a citotoxikus T limfociták (CTL-ek) sejtfunkcióját, de a transz-telítetlenek és a telítettek nem. Mi a kísérleteinkben csak *all*-cisz-telítetlen zsírsavakat használtunk, és mindegyiket hatékonyan találtuk a $K_v1.3$ csatornák kinetikájának módosítására, kivéve a egyszerűen telítetlen OA-at.

A kettősréteget alkotó lipidek, mint a foszfatidil-kolin (PC), henger alakúak. A kettősréteget nem képező, a kettősréteget alkotó lipidekénél kisebb poláris fejcsoporttal rendelkező lipidek, mint pl. a foszfatidil-etanolamin (PE), és a nagyobb poláris fejcsoporttal rendelkezők kúp alakúak, és felszíni görbülettel rendelkező hexagonális vagy köbös fázist képeznek. [209, 276] A kisebb poláris fejcsoporttal rendelkező, kettősréteget nem képező lipidek nagyobb laterális nyomást fejtenek ki a membrán közepén és kisebbet a fejcsoport irányában, ellentétben a kettősréteget képező lipidekkel, amelyekben a laterális nyomás a hidrofób fázisban sokkal kisebb. Ez a nyomásprofil kettősréteget nem képező lipidekben funkcionális állapotban képes stabilizálni egy belső fehérjét – pl. lehetővé téve a transzportfehérjéknek a nyitást és a zárást –, és a fehérjéknek egy kevésbé működőképes állapotba történő kerülését okozhatja kettősréteget képező lipidekben. Az SFA-k egyenesek, és hengeres foszfolipideket képesek létrehozni, a PUFA-k a telítetlenség mértékének növekedésével egyre hajlítotabbak, és kúp alakú foszfolipideket képesek kialakítani. Valószínűsíthető, hogy a sejtmembránba beépült SFA-k hengeres molekulákat alakítanak ki, ezzel nem okoznak drámai változásokat a foszfolipid struktúrában, és nem befolyásolják a $K_v1.3$ csatornák működését. A PUFA-k kúp alakú molekulákat alkotnak, így nem-kettősrétegű régiókat hoznak létre a membránban, és elősegítik a csatornanyitást és -zárást. Ha a zsírsavak önállóan (nem foszfolipidekbe épülve) lépnek be a lipid kettősrétegbe, akkor nagyon kicsi fejcsoportjuk (COO^-) és egy karbonilláncuk van. Az SFA-k egyenes láncsal rendelkeznek, ebből következően hengeres alakjuk van, míg a PUFA-k nagyobb, hajlítot

lánccal rendelkeznek, kúp alakot képeznek, ezért úgy viselkednek, mint a kis fejjel rendelkező, kettősréteget nem képező lipidek. Tehát a zsírsavak ugyanazt a hatást fejtik ki, bármelyik formában épülnek be a sejtmembránba.

Egy lehetséges alternatíva, hogy a limfociták PUFA-kkal történő kezelése a $K_v1.3$ csatornák protein-kinázok és -foszfatázok általi poszttranszlációs módosításával járhat, és ennek a módosulásnak a színtere a T sejtek lipid raftja lehet. Korábban már leírták, hogy a $K_v1.3$ csatornák lipid raftokban helyezkednek el a T sejt-membránban [207], és hogy az n-3 PUFA EPA szelektíven beépül a T sejt-raftokba és megváltoztatja az összetételüket [277]. Ez utóbbi tükröződik az acilált jelátviteli fehérjéknek a lipid raftok citoplazma felőli rétegéből történő kiszorításában, mint pl. az Src családbeli Lck kináz esetében. Minthogy a $K_v1.3$ aktivitását és kapuzását nagymértékben szabályozza a tirozinon [278, 279] és a szerin/treonin oldalláncokon történő foszforiláció, a limfociták jelátviteli komplexének PUFA-kkal történő történő felbomlasztása szintén egy elképzelhető lehetőség az eredményeink magyarázatára.

Beszámoltunk arról, hogy az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggése érzéketlen a PUFA-k, a MUFA vagy az SFA-k membránban történő akkumulációjára. Ez azt jelenti, hogy a csatornák egyensúlyi megoszlása a zárt és a nyitott, illetve a nem-inaktivált és az inaktivált állapotok között adott membránpotenciálon ugyanaz, tekintet nélkül a zsírsavkezelésre (pl. a $\Delta\Delta G$ a megfelelő állapotok között változatlan). Ezzel szemben a nyitott és az inaktivált állapotokba vezető kinetikákat gyorsítják a PUFA-k, ami a zárt és a nyitott, illetve a nyitott és az inaktivált állapotokat elválasztó energiakorlát (ΔG) nagyságának a csökkenésében nyilvánul meg [168]. Így a csatornkapuzás energetikáját a PUFA-k specifikusan befolyásolják, amit az átmenetek sebességei tükröznek, de az állapotok közti egyensúlyi megoszlás nem. Ez összeegyeztethető a membrán mikroviszkozitásának a csökkenésével PUFA-kezelés során [275].

Összegezve: bemutattuk, hogy a membrán különböző PUFA-kkal történő dúsítása képes módosítani a $K_v1.3$ csatornák kinetikáját a HPL-kban. Ily módon a PUFA-kban gazdag étrend fontos szereppel bírhat a membrán megfelelő lipidösszetételének a fenntartásában ahhoz, hogy ezek a csatornák megfelelően működjenek, és talán a $K_v1.3$ kinetika PUFA indukált módosítása fontos következményekkel bírhat, tekintettel a T sejtek aktivációjának gátlására patofiziológiai körülmények között. Ez közreműködhet a PUFA-kkal történő étrendkiegészítés jótékony hatásában autoimmun reakciókban és/vagy krónikus gyulladások során.

6.2. Adenozin-analógok hatása a DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek K⁺ csatornáinak működésére

Munkánk során a DDT₁ MF-2 sejtek teljessejt-áramában különböző adenozin-agonisták és –antagonisták, továbbá egy K_{ATP} csatorna-blokkoló vegyület által okozott változásokat tanulmányoztunk. A K⁺ áramnak a farmakológiai vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy a mért vezetőképességek tulajdonságai a *Shaker* családba tartozó feszültségfüggő K_v1.3-éhoz közelítenek. Kísérleteinket EGTA-val pufferelt / Ca²⁺ mentes pipettatöltő oldat alkalmazása mellett végeztük, hogy az esetleges Ca²⁺ függő áramok hozzájárulását kiküszöböljük [266]. Jelen tanulmányban bemutatott eredményeink összhangban vannak korábbi tapasztalatainkkal, melyeket Rubovszky Bálint értekezésében már bemutatott [265]. Az említett tanulmány arra utal, hogy a K⁺ áram tulajdonságaiban bekövetkezett változások során a receptorok a csatornákra G protein-független módon fejtik ki hatásukat.

Tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amelyben sikerült kimutatni a DDT₁ MF-2 sejteken levő K⁺ áram szelektív P₁ adenozinreceptor-agonistákkal és –antagonistákkal történő módosítását. Bár Mollemannak és mts-nak (1989) [262] nem sikerült kimutatniuk nagy dózisú adenozinnak (1 mM) semmiféle hatását a membránáramra vagy az ATP indukált áramokra ezen a sejtvonalon, eredményeik nem mondanak egyenesen ellent a mi tapasztalatainknak. Minthogy az adenozin nem specifikus ligandum, kötődhet P₂ receptorokhoz is, ezen kívül mind az A₁, mind az A₂ receptorokhoz történő gyenge kötődése további különböző receptor-aktivációs folyamatokat indíthat be, ami végül azt eredményezheti, hogy a K⁺ áramra gyakorolt hatás nem lesz szignifikáns. Jelen tanulmányban altípus-specifikus agonisták és antagonisták hatásait vizsgáltuk, így az egyes hatások elkülönülve jelenhettek meg.

A K⁺ csatornáknak a különböző altípus-specifikus adenozin-analógokra adott válasza szövetről szövetre változik. Például bár mind az A₁, mind az A₂ receptorok jelen vannak sertés szívkoszorúérből származó simaizom-sejteken, az A₁ adenozin-receptorhoz történő kötődés K⁺ áramot aktivál, az A_{2a}-hoz történő kötődés viszont nem [280]. Artériás szívizomsejteken csak A_{2a} receptor-agonista volt képes K⁺ csatornákat aktiválni, míg az A₁ aktivátorok hatástalannak bizonyultak [281]. Szarvasmarha-mellékvese *zona fasciculata*-ból származó sejteken a kifejeződött nem-inaktiválódó K⁺ áramot szelektíven lehetett gátolni mind A₁, mind A_{2a}, mind A₃ adenozinreceptor-agonistákkal, és ezek a gátlások membrán-depolarizációval társultak [61]. Felfedezéseink szerint a DDT₁ MF-2 sejtek egyedülállóak abban, hogy az A₁ receptor-aktivációra megnövekedett K⁺ konduktanciával és hiperpolarizációval, az A₂ receptor-aktivációra pedig csökkent K⁺ konduktanciával és

depolarizációval képesek válaszolni. Ezért ezek a sejtek jól használhatók lehetnek a farmakológiában, az A_1 és A_{2a} receptor-mediált mechanizmusok ugyanazon a sejtvonalon történő vizsgálatában.

Nemrégiben kimutatták, hogy szoros kapcsolat van a membránpotenciál és az adenilát-cikláz aktivitása között kisagyi szemcsesejtekben [65]. Beltran és mts. [282] megállapították, hogy a membránpotenciál közvetlenül módosítja az adenilátcikláz-aktivitást tengeri sünn spermájában, aminek szerepe lehet a spermamotilitás beindításában. Izumi és mts. [63] kimutatták, hogy a membrán hiperpolarizációja növeli a cAMP szintézisét, és a spermamotilitás aktiválásához vezet *Ciona intestinalis* zsákállatban. Reddy és mts. [56] az adenilátcikláz-aktivitás tenyésztett kisagyi idegsejtekben végbemenő, depolarizáció általi szinergisztikus stimulációjáról számoltak be. Feltételezték, hogy az enzim katalitikus alegységében végbemenő, depolarizáció okozta konformációs változások fokozhatják az adenilát-cikláznak a guanilát-nukleotid serkentő fehérje általi stimulációját. Arra is rámutattak, hogy ez a jelenség Ca^{2+} független, és nem tulajdonítható az intracelluláris Ca^{2+} általi szabályozásnak. Ez a felfedezés összhangban van a mi megfigyeléseinkkel és az adenilát-cikláz az irodalomban bemutatott, A_{2a} agonisták receptorhoz történő kötődése általi stimulációjával. Adataink alátámasztják azt a feltételezést, hogy az adenilát-cikláz aktivitásának a membránpotenciáltól való függése hiperpolarizált körülmények között olyan, mint amiről Reddy és mts. [56] az élettanitól a depolarizáltig terjedő membránpotenciáltartományt illetően beszámoltak. Így az A_1 adenosin-receptorokhoz történő agonista-kötődés által kiváltott adenilátcikláz-inhibíciót az indukált membránpotenciál-növekedés közvetítheti.

Az adenilát-cikláz feszültségfüggése alapján feltételezzük, hogy az adenilát-cikláz A_1 és A_2 receptor-aktiváció általi stimulációja vagy inhibíciója – vagyis a cAMP-termelés A_1 és A_2 receptoraktiváció által történő szabályozása – olyan mechanizmussal valósulhat meg, amely ligandumindukált transzmembránpotenciál-változást tartalmaz az első elemi lépések között, mivel a membránpolaritásban bekövetkező változások az enzim feszültségfüggő konformáció-változásához vezethetnek. Azt is megfigyeltük, hogy egy A_1 agonista módosíthat egy A_{2a} agonista által kiváltott membránpotenciál-változást [265]. Ez az A_{2a} és A_1 receptorok közötti kölcsönhatás az adenilát-cikláz olyan összetett szabályozásának alapjául szolgálhat, amit a nagy számú fiziológiás ligandumok közül bármely A_{2a} és A_1 specifikus agonista–antagonista párnak a megfelelő adenosin-receptorokhoz történő kötődése vált ki. A kifejeződött A_1 és A_2 típusú receptorok aránya szövetspecifikus, és a jelenlévő agonisták és antagonisták fajtája és koncentrációja is szövetről szövetre változhat. Ez a változatosság a lehetséges cAMP jel vezérelte specifikus folyamatok sokféleségével együtt megmagyarázza,

hogy az adozinreceptor-aktiváció következményei miért lehetnek annyira különbözőek a különféle szervekben és szövetekben. Az adenilát-cikláz szabályozásáról felvázolt folyamat olyan cAMP jeleket eredményez, amelyek hozzájárulhatnak a különféle módosító hatással rendelkező eseményekhez.

A két adozin-analóg, a NECA és fluorral jelölt származéka, az F-NECA eltérő hatást fejtett ki a DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek K⁺ konduktanciájára. Ez a kémiai szerkezetük különbözőségének a következménye lehet, ami az A₁ és A₂ adozinreceptorokhoz való affinitásuk eltérő mivoltához vezethet. Minthogy mind A₁, mind A₂ receptorok jelenlétét kimutatták a DDT₁ MF-2 sejteken [68], és a NECA mindkét receptornak agonistája [57], a NECA vagy az F-NECA kötődésével kiváltott funkcionális válasz az A₁ és az A₂ altípusokon keresztül mediált hatások összege. A K⁺ áram adozin-analógokkal történő szabályozása függ a cAMP képződésétől [138]. Eredményeink azt sugallják, hogy a cAMP függő jelátviteli útvonalaknak a receptorhoz történő kötődés általi stimulációja különbözik a NECA és az F-NECA esetében. Az, hogy az 5 μM F-NECA által a csúcsáramra kifejtett gátló hatás szignifikánsan kisebb az 5 μM NECA esetében tapasztaltnál, az ezeknek az analógoknak az affinitásában levő különbségeknek tulajdonítható. Ez magyarázatul szolgálhat a K⁺ áram kinetikájában okozott változásokban levő különbségekre, különösen az aktivációnál, ahol nem fedeztünk fel változást az F-NECA-val. Bár az F-NECA által az elektrofiziológiai tulajdonságokban okozott változás kevésbé kiemelkedő, mindkét vegyület csökkenti a K⁺ áramot. Ezért az F-NECA elektrofiziológiai szempontból kevésbé hatékony analóggént használható. Mivel az F-NECA másként viselkedik a vizsgált elektrofiziológiás folyamatban, mint a NECA, ezért a PET eredmények értékelésénél körültekintően kell eljárni.

Yao és mts. (1996) [74] a nyúlgyaban és -májban kifejeződő [73] feszültségkapuzott K⁺ csatornát (rabK_V1.3) *Xenopus* oocitákba klónozták. Az így kifejeződött csatornát, eltérően a korábban leírt Shaker csatornáktól, glibenclamid-érzékenynek, aktivációs küszöbét pedig -50 mV körülinek találták. (A glibenclamid a K_{ATP} csatornák jól ismert inhibitora.) A *Xenopus* oocitákban mesterségesen expresszáltatott rabK_V1.3 csatorna glibenclamid-érzékenysége ugyanolyan nagyságrendűnek bizonyult, mint a nyúl vaszkuláris simaizomban található glibenclamid-érzékeny K_V natív csatornáé [160]. A rabK_V1.3 és a DDT₁ MF-2 simaizomsejteken található K⁺ csatornákon kívüli egyéb K_V csatornák glibenclamid-szenzitivitására nem találtunk utalást az irodalomban.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során sejtmembránbeli feszültség-aktivált kationcsatornák tulajdonságait vizsgáltuk.

1. Különböző zsírsavaknak a $K_V1.3$ csatornák kinetikájára kifejtett hatását tanulmányoztuk PHA és IL-2 stimulált HPL-kon. Eredményeink szerint a kifejtett hatás összefüggésben van az adott zsírsav telítetlenségének mértékével és/vagy lánchosszával. Minden vizsgált PUFA befolyásolta a limfociták $K_V1.3$ csatornáinak aktivációs és inaktivációs kinetikáját – gyorsítva a kérdéses időállandókat –, ellentétben a vizsgált MUFA-val és SFA-kkal. Ugyanakkor a kísérleteinkben vizsgált összes zsírsav változatlanul hagyta az egyensúlyi paramétereket, vagyis az aktiváció és az inaktiváció feszültségtől való függését. A zsírsavak limfocitamembránba történő beépülésének igazolására végzett gázkromatográfiás mérések mutatják az egyes kezelések eredményességét: minden vizsgált zsírsav nagyobb mennyiségben jelent meg a limfociták plazmamembránjában, mint amennyi a kezeletlen sejtekben található volt.

Kimutattuk tehát, hogy a PUFA-k képesek módosítani a $K_V1.3$ csatornák kinetikáját HPL-kon azáltal, hogy megváltoztatják a mikrokörnyezetet a lipid kettős rétegben. Ily módon a PUFA-kban gazdag étrend fontos lehet a megfelelő lipidösszetétel fenntartásához vagy lipidkorrekció indukálásához. A T sejt-aktiváció a feszültség-kapuzott és a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák és a Ca^{2+} felszabadulás-aktivált Ca^{2+} csatornák működésén alapul, a T limfocitákban a kifejeződő $K_V1.3$ csatornák irányítják a membránpotenciált és a jelátvitelt. Ezért a $K_V1.3$ csatornák működésének PUFA indukált megváltozásai előidézhetik az immunrendszer funkciójának megváltozását. Ezek a PUFA indukált hatások hasznosak lehetnek az immunrendszer működési zavarainak és/vagy akut és krónikus gyulladásoknak a kezelésében.

2. Kimutattuk, hogy a K^+ áramok mértéke és az adenzinreceptor-stimuláció vagy -inhibíció között kapcsolat van a DDT₁ MF-2 sejtek esetében. Jelen értekezést előzetes méréseinkkel is összevetve – melyekről Rubovszky Bálint értekezésében már beszámolt [265] – megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott adenzin-agonisták és -antagonisták részt vesznek az adenzinreceptor-mediált folyamatban, és igazolják az A₁ és A₂ adenzin-receptorok

jelenlétét és aktivitását a vizsgált sejtvonalon. A K^+ áram tulajdonságaiban bekövetkezett változások során a receptorok a csatornákra G protein-független módon fejtik ki hatásukat. Ugyanakkor a vizsgált P_1 agonisták és antagonisták a sejteken levő Na^+ csatornák konduktanciáját nem befolyásolták.

A DDT₁ MF-2 sejtek egyedülállóak abban a tekintetben, hogy képesek válaszolni mind az A_1 receptor-aktivációra K^+ konduktancia-növekedéssel és hiperpolarizációval, mind az A_2 receptor-aktivációra K^+ áram-csökkenéssel és depolarizációval. Így lehetőség nyílik ezen sejtek farmakológiai felhasználására: az A_1 és A_2 receptor-mediált mechanizmusok ugyanazon sejtvonalon történő tanulmányozására.

8. SUMMARY

Characteristics of voltage-gated cation channels in the cell membrane were studied in this thesis.

1. We examined the effect of certain fatty acids (FAs) on the kinetics of $K_v1.3$ channel gating of PHA- and IL-2-stimulated human peripheral lymphocytes (HPLs). Our study indicated that the effect carried out by FAs depended on the degree of unsaturation and/or the chain length of the FAs. All of the studied polyunsaturated FAs (PUFAs) [linoleic acid (LA), arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA)] influenced the activation and inactivation kinetics of the $K_v1.3$ channels of HPLs (decreased the time constants mentioned above), whereas the monounsaturated FA (MUFA) oleic acid (OA) and the saturated FAs (SFAs) [palmitic acid (PA) and stearic acid (SA)] were ineffective. This pattern parallels the efficacy of FAs to interfere with lymphocyte activation processes. However, these FAs did not affect the voltage-dependence of steady-state activation and steady-state inactivation of the channels. The efficacy of the incorporation of FAs into the HPL membrane was confirmed by gas chromatographic measurements, each treatment specifically increased the relative contribution of the corresponding FA to the total amount of FAs in plasma membrane of HPLs.

We have demonstrated here that enrichment of the membrane with various PUFAs can modulate the kinetics of $K_v1.3$ channels in HPLs probably via alteration of microenvironment in the lipid bilayer. In this way, a diet rich in PUFAs can be important in maintaining the suitable lipid composition of the membrane for proper operation of these channels or induction of lipid correction. T-cell activation is based on the operation of the voltage-gated K^+ channels, the Ca^{2+} activated K^+ channels and the Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels, and $K_v1.3$ channels expressed in T-lymphocytes control the membrane potential and signal transduction. Therefore the PUFA-induced modification of $K_v1.3$ kinetics might have important consequences regarding the inhibition of the activation of T-cells under pathophysiological conditions. This might contribute to the beneficial effects of dietary PUFA supplement in autoimmune reactions and/or during chronic inflammation.

2. We have revealed a relationship between the order of K^+ currents and adenosine receptor stimulation or inhibition in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. On the basis of both this present study and our earlier measurements presented by Bálint Rubovszky in his Ph.D. thesis [265], we can conclude that applied adenosine agonists (NECA, F-NECA, CPA, CGS 21680) and antagonist (ZM 241385) take part in the adenosine mediated process and verify the presence of A₁ and A₂ adenosine receptors in the studied cell line. During the changes in the properties of K^+ current, receptors act on the channels in a G protein independent way. On the other hand, the examined P₁ agonists and antagonist did not influence the conductance of Na⁺ channels in this smooth muscle cells.

DDT₁ MF-2 cells have proved to be unique to response to both the A₁ receptor activation with increase in K^+ conductance and hyperpolarization, and the A₂ receptor activation with decreased K^+ current and depolarization. In this way, these cells can be useful targets of pharmacological research, because they provide the possibility of tracking A₁ and A₂ receptor mediated mechanisms on the same cell line.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Deutsch, C., Krause, D., Lee, S. C.: Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J. Physiol.* **372**, 405-423. (1986)
2. Krasznai, Z.: Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **53** (2), 127-135. (2005)
3. Lin, C. S., Boltz, R. C., Blake, J. T., Nguyen, M., Talento, A., Fischer, P. A., Springer, M. S., Sigal, N. H., Slaughter, S., Garcia, M. L.: Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **177** (3), 637-645. (1993)
4. Panyi, G., Vámosi, G., Bodnár, A., Gáspár, R., Damjanovich, S.: Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends Immunol.* **25** (11), 565-569. (2004a)
5. Panyi, G., Varga, Z., Gáspár, R.: Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* **92**, 55-66. (2004b)
6. Cahalan M. D., Chandy, K. G.: Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8** (6), 749-56. (1997)
7. Grinstein, S., Dixon, S. J.: Ion transport, membrane potential and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol. Rev.* **69** (2): 417-481. (1989)
8. Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., Cahalan, M. D., McLaughlin, C., Gupta, S.: Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **160** (2): 369-385. (1984)
9. Rader, R. K., Kahn, L. E., Anderson, G. D., Martin, C. L., Chinn, K. S., Gregory, S. A.: T cell activation is regulated by voltage-dependent and calcium-activated potassium channels. *J. Immunol.* **156** (4): 1425-1430. (1996)
10. Gelfand, E. W., Cheung, R. K., Mills, G. B., Grinstein, S.: Role of membrane potential in the response of human T lymphocytes to phytohemagglutinin. *J. Immunol.* **138** (2), 527-531. (1987)
11. Matkó, J.: K⁺ channels and T-cell synapses: the molecular background for efficient immunomodulation is shaping up. *Trends Pharmacol. Sci.* **24** (8), 385-9. (2003)
12. Fanger, M. C., Rauer, H., Neben, A. L., Miller, M. J., Rauer, H., Wulff, H., Rosa, J. C., Ganellin, C. R., Chandy, K. G., Cahalan, M. D.: Calcium-activated potassium channels

- sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J. Biol. Chem.* **276** (15), 12249-11256. (2001)
13. Lewis, R. S., Cahalan, M. D.: Ion channels and signal transduction in lymphocytes. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 415-430. (1990)
 14. Matteson, D. R., Deutsch, C.: K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* **307**, 468-471. (1984)
 15. Fanger, C. M., Neben, A. L., Cahalan, M. D.: Differential Ca^{2+} influx, K_{Ca} channel activity, and Ca^{2+} clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *J. Immunol.* **164** (3), 1153-1160. (2000)
 16. Brenner, R. R.: Effect of unsaturated acids on membrane and enzyme kinetics. *Prog. Lipid Res.* **23**, 69-96. (1984)
 17. Naisberg, Y. and Weizman, A.: Role of lipid-induced changes in plasma membrane in the biophysical shunt theory of psychopathology. *Med. Hypothesis* **48**, 277-280. (1997)
 18. Márián, T., Balkay, L., Trón, L., Krasznai, Z. T., Szabó-Péli, J., Krasznai, Z.: Effects of miltefosine on membrane permeability and accumulation of [$^{99\text{m}}$ Tc]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile, [^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, daunorubicin and rhodamine123 in multidrug-resistant and sensitive cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **24** (5), 495-501. (2005)
 19. Fong, T. M., McName, M. G.: Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* **25** (4), 830-840. (1986)
 20. Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., Ley, S. C.: Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**, 954-963. (2000)
 21. Hajdú, P., Varga, Z., Pieri, C., Panyi, G., Gáspár, R.: Cholesterol modifies the gating of $\text{K}_{\text{v}}1.3$ in human T lymphocytes. *Plugers Arch.* **445** (6), 674-682. (2003)
 22. Bastiaanse, E. M. Hold, K. M. and Van der Laarse, A.: The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in the plasma membrane. *Cardiovasc. Res.* **33**, 272-283. (1997)
 23. Bolotina, V., Omelyanenko, V., Heyes, B., Ryan, U., Bregestovski, P.: Variation of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Plugers Arch.* **415** (3), 262-268. (1989)
 24. Serebryakov, V. N., Zamoiskii, V. I., Printseva, O. Y. U., Stinnakre, J., Tyurmin, A., Bregestovski, P. D.: Effect of low-density lipoproteins on Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in

- the membrane of smooth muscle cells isolated from human fetal aorta. *Biomed. Sci.* **1** (1), 89-94. (1990)
25. Stulnig, T. M., Berger, M., Sigmund, T., Raederstorff, D., Stockinger, H. and Waldhäusl, W. Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J. Cell Biol.* **143** (3), 637-644. (1998)
 26. Calder, P.C.: N-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann. Nutr. Metab.* **41**, 203-234. (1997)
 27. Jenski, L. J., Scherer, J. M., Caldwell, L., D., Ney, V. A., Stillwell, W.: The triggering signal dictates the effect of docosahexaenoic acid on lymphocyte function in vitro. *Lipids* **33** (9), 869-878. (1998)
 28. Rotondo, D., Earl, C. R., Laing, K. J., Kaimakamis, D.: Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by fatty acids: the role of eicosanoids. *Biochim. Biophys. Acta* **1223** (2), 185-194. (1994)
 29. Baldie, G., Kaimakamis, D., Rotondo, D.: Fatty acid modulation of cytokine release from human monocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1179** (2), 125-133. (1993)
 30. Calder, P.C.: N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Adv. Enzyme Regul.* **37**: 197-237. (1997a)
 31. Jeffery, N. M., Sanderson, P., Sherrington, E. J., Newsholme, E. A., Calder, P. C.: The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids* **31** (7): 737-745. (1996)
 32. Brouard, C., Pascaud, M.: Modulation of rat and human lymphocyte function by n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and acetylsalicylic acid. *Ann. Nutr. Metab.* **37** (3): 146-159. (1993)
 33. Calder, P. C., Yaqoob, P., Newsholme, E. A.: Triacylglycerol metabolism by lymphocytes and the effect of triacylglycerols in lymphocyte proliferation. *Biochem. J.* **298**, 605-611. (1994)
 34. de Wilde, M. C., Högyes, E., Kiliaan, A. J., Farkas, T., Luiten, P. G. M., Farkas, E.: Dietary fatty acids alter blood pressure, behavior and brain membrane composition of hypertensive rats. *Brain Res.* **988**, 9-19. (2003)
 35. Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., Lazdunski, M.: Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* **19** (8), 1784-1793. (2000)

36. Kim, D., Pleumsamran, A.: Cytoplasmic unsaturated free fatty acids inhibit ATP-dependent gating of the G protein-gated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **115** (3), 287-304. (2000)
37. Yoshida, S., Sato, A. and Okuyama, H.: Pathophysiological effects of dietary essential fatty acid balance on neuronal system. *Jpn. J. Pharmacol.* **77**: 11-22. (1998)
38. Van der Vusse, G. J., Reneman, R. S., van Bilsen, M.: Accumulation of arachidonic acid in ischemic/reperfused cardiac tissue: possible causes and consequences. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **57** (1), 85-93. (1997)
39. Hrbasova, M., Novotny, J., Hejnova, L., Kolar, F., Neckar, J., Svoboda, P.: Altered myocardial Gs protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J. Appl. Physiol.* **94**: 2423-32. (2003)
40. Zou, Y., Komuro, I., Yamazaki, T., Kudoh, S., Uozumi, H., Kadowaki, T., Yazaki, Y.: Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **274**: 9760-70. (1999)
41. Pelleg, A., Porter, R. S.: The pharmacology of adenosine. *Pharmacotherapy* **10**, 157-174. (1990)
42. Yada, T., Richmond, K. N., Van Bibber, R., Kroll, K., Feigl, E. O.: Role of adenosine in local metabolic coronary vasodilation. *Am. J. Physiol.* **276**, 1425-33. (1999)
43. Brodmann, M., Stelzer, I. I., Friedl, I. I., Lueger, A., Pilger, E., Stark, G.: Comparison of the Effect of Prostaglandin E(1), Prostacycline and Adenosine on Peripheral Vascular Resistance. *Int. J. Angiol.* **10**, 31-33. (2001)
44. Belardinelli, L., Giles, W. R., West, A.: Ionic mechanisms of adenosine actions in pacemaker cells from rabbit heart. *J. Physiol.* **405**, 615-33. (1988)
45. Donahue, J. K., Orias, D., Berger, R. D., Tomaselli, G. F., Lawrence, J. H., Calkins, H.: Comparison of adenosine effects on atrioventricular node reentry and atrioventricular reciprocating tachycardias. *Clin. Cardiol.* **21**, 743-5. (1998)
46. Drury, A. N., Szent-Györgyi, A.: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **68** (3), 213-237. (1929)
47. Brand, A., Vissienon, Z., Eschke, D., Nieber, K.: Adenosine A(1) and A(3) receptors mediate inhibition of synaptic transmission in rat cortical neurons. *Neuropharmacology* **40**, 85-95. (2001)

48. Pelzmann, B., Schaffer, P., Machler, H., Rigler, B., Koidl, B.: Adenosine inhibits the L-type calcium current in human atrial myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **351**, 293-297. (1995)
49. Phillis, J. W.: Adenosine in the control of the cerebral circulation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1**, 26-54. (1989)
50. Coney, A. M., Marshall, J.M.: Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. *J. Physiol.* **509**, 507-518. (1998)
51. Bryan, P. T., Marshall, J. M.: Cellular mechanisms by which adenosine induces vasodilatation in rat skeletal muscle: significance for systemic hypoxia. *J. Physiol.* **514**, 163-75. (1999)
52. Collis, M. G.: Adenosine relaxes the aorta by interacting with an A₂ receptor and an intracellular site. *Eur. J. Pharmacol.* **96**, 61-69. (1983)
53. Szentmiklósi, A. J., Ujfalusi, A., Cseppentő, Á., Nosztray, K., Kovács, P., Szabó, J. Z.: Adenosine receptors mediate both contractile and relaxant effects of adenosine in main pulmonary artery of guinea pigs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **351**, 417-425. (1997)
54. Burnstock, G.: A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*, edited by L. Bolis and R. W. Straub, p. 107-118, Raven Press, New York, 1978
55. Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P., and Williams, M.: Nomenclature and Classification of Purinoceptors, *Pharmacol. Rev.* **46** (2), 143-156. (1994)
56. Reddy, R., Smith, D., Wayman, G., Wu, Z., Villacres, E. C., Storm, D.: Voltage-sensitive adenylyl cyclase activity in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* **46**, 143-153. (1995)
57. Stinnakre, J., Van Renterghem, C.: Cyclic adenosine monophosphate, calcium, acetylcholine, and the current induced by adenosine in the *Xenopus* oocyte. *J. Physiol. (Lond)* **374**, 551-569. (1986)
58. Holschbach, M. H., Fein, T., Krummeich, C., Lewis, R. G., Wutz, W., Schwabe, U., Unterlugauer, D., Olson, R. A.: A1 adenosine receptor agonists as ligands for positron emission tomography (PET) and single-photon emission tomography (SPET). *J. Med. Chem.* **41** (4): 555-563. (1998)

59. Márián, T., Lehel, Sz., Lengyel, Z., Balkay, L., Horváth, G., Mikecz, P., Miklovicz, T., Fekete, I., Szentmiklósi, A. J.: The [18F]FNECA serves as a suitable radioligand for PET investigation of purinergic receptor expression. *Orv. Hetil.* **143**: 1319-1322. (2002)
60. Lehel, Sz., Horváth, G., Boros, I., Mikecz, P., Márián, T., Szentmiklósi, A. J., Trón, L.: Synthesis of 5-N-(2-[F18]Fluoroethyl)-carboxamidoadenosine: A promising tracer for investigation of adenosine receptor system by PET technique. *J. Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals* **43**: 807-815. (2000)
61. Xu, L., Enyeart, J. J.: Adenosine inhibits a non-inactivating K⁺ current in bovine adrenal cortical cells by activation of multiple P₁ receptors. *J. Physiol.* **521**, 81-97. (1999)
62. Martynyuk, A. E., Kane, K. A., Cobbe, S. M., Rankin, A. C.: Adenosine increases potassium conductance in isolated rabbit atrioventricular nodal myocytes. *Cardiovas Res.* **30**, 668-675 (1995)
63. Izumi, H., Márián, T., Inaba, K., Oka, Y., Morisawa, M.: Membrane hyperpolarization by sperm-activating and -attracting factor increases cAMP level and activates sperm motility in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* **213** (2), 246-256. (1999)
64. Reddy, R., Smith, D., Wayman, G., Wu, Z., Villacres, E. C., Storm, D. R.: Voltage-sensitive adenylyl cyclase activity in cultured neurons. A calcium-independent phenomenon. *J. Biol. Chem.* **270** (24), 14340-14346. (1995)
65. Cooper, D. M. F., Schell, M. J., Thorn, P., Irvine, R. F.: Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273** (42), 27703-27707. (1998)
66. Van der Zee, L., Nelemans, A., Den Hertog, A.: Nucleotide receptors on DDT₁ MF-2 vas deferens cells. *Eur. J. Pharmacol.* **215** (2-3), 317-320. (1992)
67. Gerwins, P., Nordstedt, C., Fredholm, B. B.: Characterization of adenosine A₁ receptors in intact DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **38**, 660-666. (1990)
68. Ramkumar, V., Barrington, W. W., Jacobson, K. A., Stiles, G. L.: Demonstration of both A₁ and A₂ adenosine receptors in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **37**, 149-156. (1990)
69. Norris, J. S., Garmer, D. J., Brown, F., Popovich, K., Cornett, L. E.: Characteristics of an adenylate cyclase coupled β_2 -adrenergic receptor in a smooth muscle tumor cell line. *J. Receptor Res.* **3** (5), 623-645. (1983)
70. Molleman, A., Nelemans, A., van den Akker, J., Duin, M., den Hertog, A.: Voltage-dependent sodium and potassium, but no calcium conductances in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Pflügers Arch* **417**, 479-484. (1991a)

71. Molleman, A., Hoiting, B., Duin, M., van den Akker, J., Nelemans, A., den Hertog, A.: Potassium channels regulated by inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and internal calcium in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **266** (9), 5658-5663. (1991b)
72. King, B. F., Pintor, J., Wang, S., Ziganshin, U., Ziganshina, L. E., Burnstock, G. A.: A novel P₁ purinoceptor activates an outward K⁺ current in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276** (1), 93-100 (1996)
73. Volk, K. A., Husted, R. F., Pruchno, C. J., Stokes, J. B.: Functional and molecular evidence for *Shaker*-like K⁺ channels in rabbit renal papillary epithelial cell line. *Am. J. Physiol. (Renal, Fluid Electrolyte Physiol.)* **267**, F671-F678. (1994)
74. Yao, X., Chang, A. Y., Boulpaep, A. S., Desir, G. V.: Molecular cloning of a glibenclamide-sensitive, voltage-gated potassium channel expressed in rabbit kidney. *J. Clin. Inv.* **97**, 2525-2533. (1996)
75. Deutsch, C. Lee, S. C.: Cell volume regulation in lymphocytes. *Renal Physiol. Biochem.* **11**, 260-276. (1988)
76. Cahalan, M. D., Wulff, H., Chandy, G.: Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* **21**, 235-252. (2002)
77. Cahalan, M. D., Lewis, R. S.: Functional roles of ion channels in lymphocytes. *Semin. Immunol.* **2**, 107-117. (1990)
78. Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Goldin, A. L., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.: Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9411-9415. (1990)
79. Logsdon, N. J., Kang, J., Togo, J. A., Christian, E. P., Aiyar, J.: A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 32723-32726. (1997)
80. Gallin, E. K.: Ion channels in leukocytes. *Physiol. Rev.* **71**, 775-811. (1991)
81. Grissmer, S., Lewis, R. S., Cahalan, M. D.: Ca²⁺-activated K⁺ channels in human leukemic T cells. *J. Gen. Physiol.* **99**, 63-84. (1992)
82. Mahaut Smith, M. P., Schlichter, L. C.: Ca²⁺(+)-activated K⁺ channels in human B lymphocytes and rat thymocytes. *J. Physiol. Lond.* **415**, 69-83. (1989)
83. Lee, S. C., Levy, D. I., Deutsch, C.: Diverse K⁺ channels in primary human T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* **99**, 771-793. (1992)
84. Lewis, R. S. Cahalan, M. D.: Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 623-653. (1995)

85. Imboden, J. B., Stobo, J. D.: Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* **161**, 446-456. (1985)
86. Weissman, A. M.: The T-cell antigen receptor: A multisubunit signalling complex. *Chem. Immunol.* **59**, 1-18. (1994)
87. Cahalan, M. D., Wulff, H. and Chandy, K.G.: Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* **21**, 235-252. (2001)
88. Bental, M., Deutsch, C.: Metabolic changes in activated T cells: an NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magn. Reson. Med.* **29**, 317. (1993)
89. Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A., Crabtree, G. R.: Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241** (4862), 202-205. (1988)
90. Gáspár, R. Jr., Panyi, G., Ypey, D. L., Krasznai, Z., Vereb, G., Pieri, C. and Damjanovich, S.: Effects of bretylium tosylate on voltage-gated potassium channels in human T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **46** (4), 762-766. (1994)
91. Koo, G. C., Blake, J. T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotina, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D. Jr., Cunningham, P., Wunderler, D. L., McManus, O. B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N. H., Springer, M. S., Feeney, W.: Blockade of the voltage-gated potassium channel K_v1.3 inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* **158** (11), 5120-5128. (1997)
92. Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., Reuben, J. P.: Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 10094-10098. (1992)
93. Price, M., Lee, S. C., Deutsch, C.: Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 10171-10175. (1989)
94. Freedman, B. D., Price, M., Deutsch, C.: Evidence for voltage modulation of IL2 production by human blood lymphocytes. *J. Immunol.* **149**, 3784-3794. (1992)
95. Grinstein, S., Smith, J. D.: Calcium-independent cell volume regulation in human T lymphocytes. Inhibition by charybdotoxin. *J. Gen. Physiol.* **95**, 97-120. (1990)
96. Chandy, K. G.: Simplified gene nomenclature [letter]. *Nature* **352**, 26-26. (1991)
97. MacKinnon, R.: Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235. (1991)

98. Monks, S. A., Needleman, D. J., Miller, C.: Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the Shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **113** (3), 415-423. (1999)
99. Hong, K. H., Miller, C.: The lipid-protein interface of a Shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **115** (1), 51-58. (1999)
100. Shao, X. M., Papazian, D. M.: S4 mutations alter the single-channel gating kinetics of Shaker K⁺ channels. *Neuron* **11** (2), 343-352. (1993)
101. Alabi, A. A., Bahamonde, M. I., Jung, H. J., Kim, J. I., Swartz, K. J.: Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors. *Nature* **470** (7168), 370-375. (2007)
102. Guy, H. R., Seetharamulu, P.: Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (2), 508-512. (1986)
103. MacKinnon, R., Heginbotham, L., Abramson, T.: Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron* **5** (6), 767-771. (1990)
104. Yool, A. J., Schwarz, T. L.: Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349** (6311), 657-658. (1991)
105. Hartmann, H. A., Kirsh, G. E., Drewe, J. A., Taglialatela, M., Joho, R. H., Brown, A. M.: Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science* **251** (4996), 942-944. (1991)
106. Lipkind, G. M., Hanek, D. A., Fozzard, H. A.: A structural motif for the voltage-gated potassium channel pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (20), 9215-9219. (1995)
107. Yellen, G.: The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**, 35-42. (2002)
108. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R.: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280** (5360), 69-77. (1998)
109. Long, S. B., Campbell, E. B., MacKinnon, R.: Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897-903. (2005a)
110. Hackos, D. H., Chang, T. H., Swartz, K. J.: Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **119** (6), 521-532. (2002)
111. Lu, Z., Klem, A. M., Ramu, Y.: Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **120**, 663-676. (2002)

112. Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwartz, T. L., Jan, L. Y., Jan, Y. N.: Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* **237**, 770-775. (1987)
113. Pongs, O. et al.: *EMBO J.* **7**, 1087. (1988)
114. Kamb, A., Iverson, L. E., Tanouye, M. A.: Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50** (3), 405-413. (1987)
115. Kreusch, A., Pfaffinger, P. J., Stevens, C. F., Choe, S.: Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* **392** (6679), 945-948. (1998)
116. Gulbis, J. M., Zhou, M., Mann, S., Mackinnon, R.: Structure of the cytoplasmic β subunit-T1 assembly of voltage-dependent K^+ channels. *Science* **289** (5476), 123-127. (2000)
117. Sokolova, O., Kolmakova-Partensky, L., Grigorieff, N.: Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure (Camb.)* **9** (3), 215-220. (2001)
118. Kobertz, W. R., Williams, C., Miller, C.: Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated $K(+)$ channel. *Biochemistry* **39** (34), 10347-10352. (2000)
119. Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W.: Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250** (4980), 533-538. (1990)
120. Zagotta, W. N., Hoshi, T., Aldrich, R. W.: Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* **250** (4980), 568-571. (1990)
121. Sewing, S., Roeper, J., Pongs, O.: K_v beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* **16** (2), 455-463. (1996)
122. Yu, W., Xu, J., Li, M.: NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels. *Neuron* **16** (2), 441-453. (1996)
123. Gulbis, J. M., Mann, S., MacKinnon, R.: Structure of a voltage-dependent K^+ channel beta subunit. *Cell* **97** (7), 943-952. (1999)
124. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R.: X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel. *Nature* **423**, 33-41. (2003)
125. Lu, Z., Klem, A.M., Ramu, Y.: Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* **413**, 809-813. (2001)

- 126.Soler-Llavina, G. J., Chang, T-H., Swartz, K. J.: Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the shaker K_V channel. *Neuron* **52**, 623-634. (2006)
- 127.Long, S. B., Campbell, E. B., MacKinnon, R.: Voltage sensor of K_V1.2: Structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**, 903. (2005b)
- 128.Ramu, Y., Xu, Y., Lu, Z.: Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature* **442**, 696-699. (2006)
- 129.Bezanilla, F.: The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* **80** (2), 555-592. (2000)
- 130.Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S., Isacoff, E. Y.: Transmembrane movement of the Shaker K⁺ channel S4. *Neuron* **16** (2), 387-397. (1996)
- 131.Baker, O. S., Larsson, H. P., Mannuzu, L. M., Isacoff, E. Y.: Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in Shaker K⁺ channel gating. *Neuron* **20** (6), 1283-1294. (1998)
- 132.Aziz, Q. H., Partridge, C. J., Munsey, T. S., Sivaprasadario, A.: Depolarization induces intersubunit cross-linking in a S4 cysteine mutant of the Shaker potassium channel. *J. Biol. Chem.* **277** (45), 42719-42725. (2002)
- 133.Ledwell, J. L., Aldrich, R. W.: Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* **113**, 389-414. (1999)
- 134.Hille, B.: Ion channels of excitable membranes. 3rd edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Mass., USA, a) p. 580 b) p. 624 (2001)
- 135.Zagotta, W. N., Hoshi, T., Aldrich, R. W.: Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* **103** (2): 321-362. (1994)
- 136.Bezanilla, F., Perozo, E., Stefani, E.: Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation. *Biophys. J.* **66**, 1011-1021. (1994)
- 137.Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W.: Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.* **103**, 249-278. (1994)
- 138.Ralevic, V., Burnstock, G.: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-492. (1998)
- 139.Pathak, M., Kurtz, L., Tombola, F., Isacoff, E.: The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **125**, 57-69. (2005)
- 140.Perozo, E., Santacruz-Toloza, L., Stefani, E., Bezanilla, F., Papazian, D. M.: S4 mutations alter gating currents of Shaker K⁺ channels. *Biophys. J.* **66**, 345-354. (1994)

- 141.Schoppa, N. E. and Sigworth, F. J.: Activation of shaker potassium channels. I. Characterization of voltage- dependent transitions. *J. Gen. Physiol.* **111**, 271-294. (1998a)
- 142.Schoppa, N. E. and Sigworth, F. J.: Activation of Shaker potassium channels. II. Kinetics of the V2 mutant channel. *J. Gen. Physiol.* **111**, 295-311. (1998b)
- 143.Schoppa, N. E. and Sigworth, F. J.: Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *J. Gen. Physiol.* **111**, 313-342. (1998c)
- 144.Smith-Maxwell, C. J., Ledwell, J. L., Aldrich, R. W.: Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* **111**, 399-420. (1998a)
- 145.Smith-Maxwell, C. J., Ledwell, J. L., Aldrich, R. W.: Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* **111**, 421-439. (1998b)
- 146.Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., Bezanilla, F.: Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* **66**, 996-1010. (1994)
- 147.Zagotta, W. N., Hoshi, T., Aldrich, R. W.: Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* **103**, 321-362. (1994a)
- 148.Zagotta, W. N., Hoshi, T., Dittman, J., Aldrich, R. W.: Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J. Gen. Physiol.* **103**, 279-319. (1994b)
- 149.Ding, S. and Horn, R.: Slow photo-cross-linking kinetics of benzophenone-labeled voltage sensors of ion channels. *Biochemistry* **40**, 10707-10716. (2001)
- 150.Horn, R., Ding, S., Gruber, H. J.: Immobilizing the moving parts of voltage-gated ion channels. *J. Gen. Physiol.* **116**, 461-476. (2000)
- 151.Mannuzzu, L. M. and Isacoff, E. Y.: Independence and cooperativity in rearrangements of a potassium channel voltage sensor revealed by single subunit fluorescence. *J. Gen. Physiol.* **115**, 257-268. (2000)
- 152.del Camino, D., Kanevsky, M., Yellen, G.: Status of the intracellular gate in the activated-not-open state of shaker K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **126**, 419-428. (2005)
- 153.Lee, S. Y., Lee, A., Chen, J., Mackinnon, R.: Structure of the K_vAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15441-15446. (2005)
- 154.Cahalan, M. D., Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., Gupta, S.: A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Physiol. (Lond)* **358** (1), 197-237. (1985)
- 155.Bezanilla, F., Perozo, E., Papazian, D. M., Stefani, E.: Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science* **254** (5032), 679-683. (1991)

156. Perozo, E., Papazian, D. M., Stefani, E., Bezanilla, F.: Gating currents in Shaker K⁺ channels. Implications for activation and inactivation models. *Biophys J.* **62** (1), 160-168. (1992)
157. Demo, S. D., Yellen, G.: The inactivation gate of the shaker K⁺ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* **7** (5), 743-753. (1991)
158. Murrell-Lagnado, R. D. and Aldrich, R. W.: Energetics of Shaker K channels blocked by inactivation peptides. *J. Gen. Physiol.* **102**, 977-1004. (1993a)
159. Murrell-Lagnado, R. D. and Aldrich, R. W.: Interactions of the amino terminal domains of Shaker K channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J. Gen. Physiol.* **102**, 949-976. (1993b)
160. Beech, D. J., Zhang, H., Nakao, K., Bolton, T. B.: Single channel and whole-cell K-currents evoked by leucromakalin in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 583-590. (1993)
161. Hashimoto, Y., Nunoki, K., Kudo, H., Ishii, K., Taira, N., Yanagisawa, T.: Changes in the inactivation of rat K_v1.4 K⁺ channels induced by varying the number of inactivation particles. *J. Biol. Chem.* **275**, 9358-9362. (2000)
162. MacKinnon, R., Aldrich, R. W., Lee, A. W.: Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **262**, 757-759. (1993)
163. Lee, T. E., Philipson, L. H., Nelson, D. J.: N-type inactivation in the mammalian Shaker K⁺ channel K_v1.4. *J. Membrane Biol.* **151**, 225-235. (1996)
164. Choi, K. L., Aldrich, R. W., Yellen, G.: Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (12), 5092-5095. (1991)
165. Roux, M. J., Olcese, R., Toro, L., Bezanilla, F., Stefani, E.: Fast inactivation in Shaker K⁺ channels—properties of ionic and gating currents. *J. Gen. Physiol.* **111**, 625-638. (1998)
166. Kuwara, H. T. and Fedida, D.: A structural interpretation of voltage-gated potassium channel activation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **92** (2), 185-208. (2006)
167. Oliver, D., Lien, C. C., Soom, M., Baukrowitz, T., Jonas, P., Fakler, B.: Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* **304**, 265-270. (2004)
168. Panyi, G., Sheng, Z., Tu, L., Deutsch, C.: C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys. J.* **69**, 896-903. (1995)

- 169.Ogielska, E. M., Zagotta, W. N., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Haab, J., Aldrich, R. W.: Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels. *Biophys. J.* **69**, 2449-2457. (1995)
- 170.Loots, E. and Isacoff, E. Y.: Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **112**, 377-389. (1998)
- 171.Loots, E. and Isacoff, E. Y.: Molecular coupling of S4 to a K⁺ channel's slow inactivation gate. *J. Gen. Physiol.* **116**, 623-635. (2000)
- 172.Olcese, R., Latorre, R., Toro, L., Bezanilla, F., Stefani, E.: Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **110**, 579-589. (1997)
- 173.Olcese, R., Sigg, D., Latorre, R., Bezanilla, F., Stefani, E.: A conducting state with properties of a slow inactivated state in a Shaker K⁺ channel mutant. *J. Gen. Physiol.* **117**, 149-163. (2001)
- 174.Chen, F. S. P., Steele, D., Fedida, D.: Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K⁺ channel deactivation. *J. Gen. Physiol.* **110**, 87-100. (1997)
- 175.Fedida, D., Bouchard, R., Chen, F. S.: Slow gating charge immobilization in the human potassium channel K_v1.5 and its prevention by 4-aminopyridine. *J. Physiol.* **494** (2), 377-387. (1996)
- 176.Wang, Z., Fedida, D.: Gating charge immobilization caused by the transition between inactivated states in the K_v1.5 channel. *Biophys. J.* **81**, 2614-2627. (2001)
- 177.Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W.: Two types of inactivation on Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7** (4), 547-556. (1991)
- 178.Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W.: Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533-538. (1990)
- 179.Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Aldrich, R. W.: Effects of external cations and mutations in the pore region on C type inactivation of Shaker potassium channels. *Recept. Channels* **1**, 61-71. (1993)
- 180.Molina, A., Castellano, A. G., López-Barneo, J.: Pore mutations in Shaker K⁺ channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J. Physiol.* **499** (2), 361-367. (1997)
- 181.Baukrowitz, T., Yellen, G.: Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* **15**, 951-960. (1995)

182. Yellen, G.: The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quart. Rev. Biophys.* **31**, 239-295. (1998)
183. Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., Strauss, H. C.: Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ. Res.* **82**, 739-750. (1998)
184. Wang, S., Morales, M. J., Qu, Y. J., Bett, G. C., Strauss, H. C., Rasmusson, R. L.: K_v1.4 channel block by quinidine: evidence for a drug-induced allosteric effect. *J. Physiol.* **546**, 387-401. (2003)
185. Russell, S. N., Publicover, N. G., Hart, P. J., Carl, A., Hume, J. R., Sanders, K. M., Horowitz, B.: Block by 4-aminopyridine of a K_v1.2 delayed rectifier K⁺ current expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **481** (3), 571-584. (1994)
186. Castle, N. A., Fadous, S. R., Logothetis, D. E., Wang, G. K.: 4-Aminopyridine binding and slow inactivation are mutually exclusive in rat K_v1.1 and Shaker potassium channels. *Mol. Pharmacol.* **46**, 1175-1181. (1994)
187. Bett, G. C. and Rasmusson, R. L.: Inactivation and recovery in K_v1.4 K⁺ channels: lipophilic interactions at the intracellular mouth of the pore. *J. Physiol.* **556**, 109-120. (2004)
188. Grissmer, S., Cahalan, M. D.: TEA prevents inactivation while blocking open K⁺ channels in human T lymphocytes. *Biophys. J.* **55**, 203-206. (1989)
189. Verheugen, J. A., Vijverberg, H. P., Oortgiesen, M., Cahalan, M. D.: Voltage-gated and Ca(2+)-activated K⁺ channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential, and intracellular calcium. *J. Gen. Physiol.* **105** (6), 765-794. (1995)
190. Pahapill, P. A., Schlichter, L. C.: Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes. *J. Physiol. (Lond)* **445**, 407-430. (1992)
191. Panyi, G., Berecki, G., Gáspár, R., Seres, I., Fülöp, T., Damjanovich, S.: Peripheral blood lymphocytes display reduced K⁺ channel activity in aged humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199** (2), 519-524. (1994)
192. Sands, S. B., Lewis, R. S., Cahalan, M. D.: Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* **93**, 1061-1074. (1989)
193. Novick, J., Leonard, R. J., King, V. F., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L.: Purification and characterization of two novel peptidyl toxins directed against K⁺ channels from venom of new world scorpions. *Biophys. J.* **59**, 78a Abstract. (1991)

194. Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T., MacKinnon, R.: Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* **251**, 939-942. (1991)
195. Choquet, D., Korn, H.: Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* **99**, 217-240. (1992)
196. Singer, S. J., Nicolson, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731. (1972)
197. Frye, L. D., Edidin, M.: The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* **7** (2), 319-335. (1970)
198. Damjanovich, S., Szöllősi, J. and Edidin, M.: *Mobility and proximity of biological membranes*. CRC Press Inc. Boca Raton 1994.
199. Wisniewska, A., Draus, J., Subczynski, W. K.: Is a fluid-mosaic model of biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes. *Cell Mol. Biol. Lett.* **8** (1), 147-159. (2003)
200. Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., van Deenen, L. L. M.: Membrane symmetry and blood coagulation. *Nature* **268**, 358-360. (1977)
201. Damjanovich, S., Gárpár, R. Jr., Pieri, C.: Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane. *Q. Rev. Biophys.* **30** (1): 67-106. (1997)
202. Damjanovich, S., Vámosi, G., Bodnár, A., Bene, L.: New trends in studying structure and function biological membranes. *Acta Physiol. Hung.* **89** (4), 415-425. (2002)
203. Vereb, G., Szöllősi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vígh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. A., Damjanovich, S.: Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (14), 8053-8058. (2003)
204. Jenei, A., Varga, S., Bene, L., Mátyus, L., Bodnár, A., Bacsó, Z., Pieri, C., Gárpár, R. Jr., Farkas, T., Damjanovich, S.: HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (14): 7269-7274. (1997)
205. Martens, J. R., Navarro-Polanco, R., Coppock, E. A., Nishiyama, A., Parshley, L., Grobaski, T. D. and Tamkun, M. M.: Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J Biol Chem* **275**, 7443-7446. (2000)
206. Martens, J. R., Sakamoto, N., Sullivan, S. A., Grobaski, T. D., Tamkun, M. M.: Isoform-specific localization of voltage-gated K⁺ channels to distinct lipid raft populations. Targeting of K_v1.5 to caveolae. *J. Biol. Chem.* **276** (11), 8409-8414. (2001)

- 207.Panyi, G., Bagdány, M., Bodnár, A., Vámosi, G., Szentesi, G., Jenei, A., Mátyus, L., Varga, S., Waldmann, T. A., Gáspár, R., Damjanovich, S.: Colocalization and nonrandom distribution of K_v1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (5), 2592-2597. (2003)
- 208.Somogyi J.: A biomembránok szerkezete és működése I. Akadémiai kiadó, Budapest (1989)
- 209.Lundbæk, J. A., Birn, P., Girshman, J., Hansen, A. J., Andersen, O. S.: Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry* **35** (12), 3825-3830. (1996)
- 210.Tillman, T. S., Cascio, M.: Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem. Biophys.* **38** (2), 161-190. (2003)
- 211.Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., Ley, S. C.: Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**, 954-963. (2000)
- 212.Stulnig, T. M., Berger, M., Sigmund, T., Stockinger, H., Horejsi, V., Waldhausl, W.: Signal transduction via glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* **272** (31), 19242-19247. (1997)
- 213.Anel, A., Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M.: Membrane partition of fatty acids and inhibition of T cell function. *Biochemistry* **32** (2), 530-536. (1993)
- 214.Devor, C. and Frizzell, R. A.: Modulation of K⁺ channels by arachidonic acid in T84 cells. II. Activation of a Ca²⁺-independent K⁺ channel. *Am. J. Physiol.* **274**: 149-160. (1998a)
- 215.Xiao, Y.-F., Sigg, D. C., Leaf, A.: The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism. *J. Membrane Biol.* **206**, 141-154. (2005)
- 216.Larsson, O., Deeney, J. T., Branstrom, R., Berggren, P. O., Corkey, B. E.: Activation of the ATP-sensitive K⁺ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *J. Biol. Chem.* **271** (18), 10623-10626. (1996)
- 217.Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., Lazdunski, M.: Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* **19** (8), 1784-1793. (2000)
- 218.Rouzaire-Dubois, B., Gerard, V., Dubois, J. M.: Modification of K⁺ channel properties induced by fatty acids in neuroblastoma cells. *Pflugers Arch.* **419** (5), 467-471. (1991)

- 219.Crumb, W. J., Munfakh, N., Heck, H. A. and Harrison, L. H.: Fatty acid block of the transient outward current in adult human atrium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 386-391. (1999)
- 220.Devor, C. and Frizzell, R. A.: Modulation of K⁺ channels by arachidonic acid in T84 cells. I. Inhibition of the Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *Am. J. Physiol.* **274**, 138-148. (1998b)
- 221.Ahn, D. S., Kim, Y. B., Lee, Y. H., Kang, B. S., Kang, D. H.: Fatty acids directly increase the activity of Ca²⁺-activated K⁺ channels in rabbit coronary smooth muscle cells. *Yonsei Med. J.* **35** (1), 10-24. (1994)
- 222.Clarke, A. L., Petrou, S., Walsh, J. V. Jr., Singer, J. J.: Modulation of BK(Ca) channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanism of action. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283** (5), C 1441-53. (2002)
- 223.Andersen, O. S., Nielsen, C., Maer, A. M., Lundbaek, J. A., Goulian, M., Koeppe, II, R. E.: Ion channels as tools to monitor lipid bilayer-membrane protein interactions: gramicidin channels as molecular force transducers. *Meth. Enzymol.* **294**, 208-224. (1999)
- 224.Lundbaek, J. A., Maer, A. M., Andersen, O. S.: Lipid bilayer energy, curvature stress and assembly of gramicidin channels. *Biochemistry* **36**, 5695-5701. (1997)
- 225.Xiao, Y.-F., Kang, J. X., Morgan, J. P., Leaf, A.: Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc. Nat., Acad. Sci. USA* **92**, 11000-11004. (1995)
- 226.Leaf, A., Xiao, Y.-F.: The modulation of ionic currents in excitable tissues by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Membrane Biol.* **184**, 263-271. (2001)
- 227.Xiao, Y.-F., Ke, Q., Wang, S. Y., Auktor, K., Yang, Y., Wang, G. K., Morgan, J. P., Leaf, A.: Single point mutations affect fatty acid block of human myocardial sodium channel alpha subunit Na⁺ channels. *Proc. Nat., Acad. Sci. USA* **98**, 3606-3611. (2001)
- 228.Darnell, J. E.: Molecular cell biology, Scientific American Books (1990)
- 229.Hill, C. S., Treisman, R.: Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**: 199-211. (1995)
- 230.Barik, S: Protein phosphorylation and signal transduction. *Subcell. Biochem.* **26**: 115-164. (1996)
- 231.Schlessinger, J.: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103** (2): 211-225. (2000)
- 232.Stork, P. J., Schmitt, J. M.: Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **12**: 258-266. (2002)

- 233.Hanke, S., Nurnberg, B., Groll, D. H., Liebmann, C.: Cross talk between beta-adrenergic and bradykinin B(2) receptors results in cooperative regulation of cyclic AMP accumulation and mitogen-activated protein kinase activity. *Mol. Cell Biol.* **21**: 8452-60. (2001)
- 234.Freissmuth, M., Schütz, W., Linder, M. E.: Interactions of the bovine brain A₁-adenosine receptor with recombinant G protein α -subunits. Selectivity for rG_i α -3. *J. Biol. Chem.* **266**, 17778-17783. (1991)
- 235.Munshi, R., Pang, I-H., Sternweis, P. C., Linden, J.: A₁ adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G_{i1}, G_{i2} and G₀. *J. Biol. Chem.* **266**, 22285-22289. (1991)
- 236.van Calker, D, Muller, M., Hamprecht, B.: Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature (Lond.)* **276**, 839-841. (1978)
- 237.Londos, C., Cooper, D. M. F., Wolff, J.: Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2551-2554. (1980)
- 238.Trussel, L. O., Jackson, M. B.: Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4857-4861. (1985)
- 239.Gerwins, P., Fredholm, B. B.: ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via formation of inositol 1,4,5-trisphosphate in a smooth muscle cell line. *J. Biol. Chem.* **267**, 16081-16087. (1992)
- 240.Gerwins, P., Fredholm, B. B.: Adenosine A₁ agonists stimulate protein kinase C in a smooth muscle cell line. *J. Biol. Chem.* (1994)
- 241.Scholz, K. P., Miller, R. J.: Analysis of adenosine actions on Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **435**, 373-393. (1991)
- 242.Burnstock, G.: Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol Rev.* **87**, 659-797. (2007). Abbracchio, M.P. and Burnstock, G.: Purinoceptors: are there families of P_{2X} and P_{2Y} purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **64** (3), 445-475. (1994)
- 243.Abracchio, M.P., Burnstock, G.: Purinoceptors: Are there families of P_{2X} and P_{2Y} purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **64**, 445-475(1994)
- 244.Jacobson, K. A., van Galen, P. J., Williams, M.: Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationship and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* **35** (3): 407-422. (1992)

245. Scalia, S., Simeoni, S., Dalpiaz, A., Villani, S.: Determination of the adenosine A₁ agonist N⁶-cyclopentyladenosine in rat blood by solid-phase extraction and HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24** (5-6): 1131-1136. (2001)
246. Ueeda, M., Thompson, R. D., Arroyo, L. H., Olson, R. A.: 2-Aralkoxyadenosines: potent and selective agonists at the coronary artery A₂ adenosine receptor. *J. Med. Chem.* **34** (4): 1340-1344. (1991)
247. Bruns, R. F., Lu, G. H., Pugsley, T. A.: Characterization of the A₂ adenosine receptor labelled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **29** (4): 331-346. (1986)
248. van Tilburg, E. W., von Frijtag Drabbe Künzel, J., de Groote, M., Vollinga, R. C., Lorenzen, A., Ijzerman, A. P.: N⁶,5'-disubstituted adenosine derivatives as partial agonists for the human adenosine A₃ receptor. *J. Med. Chem.* **42** (8): 1393-1400. (1999)
249. Jacobson, K. A., Gallo-Rodriguez, C., Melman, N., Fisher, B., Maillard, M., van Bergen, A., van Gallen, P. J., Karton, J. Y.: Structure-activity relationship of 8-styrylxantines as A₂-selective adenosine antagonists. *J. Med. Chem.* **36** (10): 1333-1342. (1993)
250. Nayeem, M. A., Mustafa, S. J.: Protein kinase C isoforms and A₁ adenosine receptors in porcine coronary smooth muscle cells. *Vascul. Pharmacol.* **39**: 47-54. (2002)
251. McCormack, D. G., Clarke, B., Barnes, P. J.: Characterization of adenosine receptors in human pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* **256**: 41-46. (1989)
252. Price, J. M., Cabell, F., Hellerman, A.: Inhibition of cAMP mediated relaxation in rat coronary vessels by block of Ca⁺⁺ activated K⁺ channels. *Life Sci.* **58**, 2225-2232. (1996)
253. Shimizu, S., Yokoshiki, H., Sperelakis, N., Paul, R. J.: Role of voltage-dependent and Ca(2+)-activated K(+) channels on the regulation of isometric force in porcine coronary artery. *J. Vasc. Res.* **37**, 16-25. (2000)
254. Hein, T. W., Kuo, L.: cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine: role of nitric oxide, G proteins, and K_{ATP} channels. *Circ. Res.* **85**, 634-642. (1999)
255. Cabell, F., Weiss, D. S., Price, J. M.: Inhibition of adenosine-induced coronary vasodilation by block of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **267**, 1455-1460. (1994)
256. Kuo, L., Chancellor, J. D.: Adenosine potentiates flow-induced dilation of coronary arterioles by activating K_{ATP} channels in endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **269**, 541-549. (1995)
257. Heaps, C. L., Bowles, D. K.: Gender-specific K(+)-channel contribution to adenosine-induced relaxation in coronary arterioles. *J. Appl. Physiol.* **92**, 550-558. (2002)

258. Norris, J. S., Kohler, P. O.: Androgen receptors in a Syrian hamster ductus deferens tumor cell line. *Nature* **248**, 422-424. (1974)
259. Ramkumar, V., Olah, M. E., Jacobson, K. A., Stiles, G. L.: Distinct pathways of desensitization of A₁- and A₂-adenosine receptors in DDT₁ MF-2 cells. *Mol. Pharmacol.* **40**, 639-647. (1990)
260. Lomasney, J. W., Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Regan, J. W., DeBernardis, J. F., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J.: Mammalian α_1 -adrenergic receptor purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *J. Biol. Chem.* **261**, 7710-7716. (1986)
261. Mitsuhashi, M., Payan, D. G.: Phorbol ester-mediated desensitization of histamine H₁ receptors on a cultured smooth muscle cell line. *Life Sci.* **43**, 1433-1440. (1988)
262. Molleman, A., Nelemans, A., den Hertog, A.: P₂-purinoceptor-mediated membrane currents in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **169**, 167-174. (1989)
263. Gerwins, P., Fredholm, B. B.: Glucocorticoid receptor activation leads to up-regulation of adenosine A₁ receptors and down-regulation of adenosine A₂ responses in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **40**, 149-155. (1991)
264. Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509. (1957)
265. Rubovszky Bálint: Ioncsatornák szerepe egyes sejtfunkciók aktivációjában. Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés (2004)
266. Grissmer, S., Nguyen, A. N. and Cahalan, M. D.: Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* **102**, 601-630. (1993)
267. Decoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S. and Cahalan, M. D.: Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* **307**, 465-468. (1984)
268. Wulff, H., Calabresi, P. A., Allie, R., Yun, S., Pennington, M., Beeton, C. and Chandy, K. G.: The voltage-gated K_v1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J. Clin. Invest.* **111**, 1703-1713. (2003)
269. de Wilde, M. C., Högyes, E., Kiliaan, A. J., Farkas, T., Luiten, P. G. M., Farkas, E.: Dietary fatty acids alter blood pressure, behavior and brain membrane composition of hypertensive rats. *Brain Res.* **988**, 9-19. (2003)
270. Long, S. B., Campbell, E. B., MacKinnon, R.: Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897-903. (2005a)

271. Long, S. B., Campbell, E. B., MacKinnon, R.: Voltage sensor of K_V1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**, 903-908. (2005b)
272. Cuello, L. G., Cortes, D. M., Perozo, E.: Molecular architecture of the K_VAP voltage-dependent K⁺ channel in a lipid bilayer. *Science* **306**, 491-495. (2004)
273. Li-Smerin, Y., Swartz, K. J.: Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J. Gen. Physiol.* **115**, 673-684. (2000)
274. Andersen, O. S., Nielsen, C., Maer, A. M., Lundbaek, J. A., Goulian, M., Koeppe, R. E.: Ion channels as tools to monitor lipid bilayer-membrane protein interactions: gramicidin channels as molecular force transducers. *Methods Enzymol.* **294**, 208-224. (1999)
275. Feller, S. E., Gawrish, K., MacKerrel, A. D.: Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2), 318-326. (2002)
276. de Kruijff, B.: Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1** (4), 564-569. (1997)
277. Stulnig, T. M., Huber, J., Leitinger, N., Imre, E. M., Angelisova, P., Nowotny, P., Waldhausl, W.: Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J. Biol. Chem.* **276** (40), 37335-37340. (2001)
278. Szabo, I., Gulbins, E., Apfel, H., Zhang, X., Barth, P., Busch, A. E., Schlottmann, K., Pongs, O., Lang, F.: Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* **271**, 20465-20469. (1996)
279. Gulbins, E., Szabo, I., Baltzer, K., Lang, F.: Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 7661-7666. (1997)
280. Dart, C., Standen, N. B.: Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J. Physiol. (Lond)* **471**, 767-786. (1993)
281. Kleppish, T., Nelson, M. T.: Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A₂ receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 12441-12445. (1995)
282. Beltran, C., Zapatta, O., Darszon, A.: Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylyl cyclase. *Biochemistry* **35**, 7591-7598. (1996)

10. KÖZLEMÉNYEK

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Székely, A., Kitajka, K., Panyi, Gy., Márián, T., Krasznai, Z.: Nutrition and immune system: Certain fatty acids differently modify membrane composition and consequently kinetics of K_v1.3 channels of human peripheral lymphocytes. *Immunobiology* **212** (3), 213-227. (2007).

IF: 1,812

Rubovszky, B., Márián, T., Szentmiklósi J. A., Cseppentő, Á., Gesztelyi, R., **Székely, A.**, Fórizs, F., Gáspár, R., Krasznai, Z.: Comparative pharmacological studies on the A₂ adenosine receptor agonist 5'-N-ethyl-carboxamidoadenosine and its ¹⁹F isotope labelled derivative. *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 356-363. (2003). **IF: 1,792**

Márián, T., Rubovszky, B., Szentmiklósi J. A., Trón, L., Balkay, L., Boros, I., Gáspár, R., **Székely, A.**, Krasznai, Z.: A₁ and A₂ adenosine receptor activation inversely modulates potassium currents and membrane potential in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **89**, 366–372. (2002). **IF: 1,792**

10.2. Egyéb közlemények

Lévai, A., Adam, W., Jekő, J., Patonay, T., **Székely A.** and Vass, E. B.: A comparative study of the epoxidation of 2-substituted isoflavones by dimethyldioxirane, sodium hypochlorite, and alkaline hydrogen peroxide (Weitz–Scheffer reaction). *J. Heterocyclic Chem.* **37**, 1065–1069. (2000). **IF: 0,735**

10.3. Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek, megjelent absztraktok, előadáskivonatok

Székely A., Krasznai Z.: Modification of kinetics of K_v1.3 channels of human peripheral lymphocytes by certain fatty acids. *ISAC XXII International Congress*, Montpellier, Franciaország, 2004. (poszter)

Székely A., Kitajka K., Krasznai Z.: A humán perifériás limfociták $K_v1.3$ csatornáinak kinetikája és membránjának összetétele egyes zsírsavak hatására megváltozik. *XXXIV. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2004. (poszter)

Székely A., Kitajka K., Krasznai Z.: Egyes zsírsavak hatására megváltozik a humán perifériás limfociták $K_v1.3$ csatornáinak kinetikája és membránjának összetétele. *IV. Sejtanalitikai konferencia*, Budapest, 2004. (poszter)

Székely A., Krasznai Z.: Certain fatty acids differently modify kinetics of $K_v1.3$ channels of human peripheral lymphocytes. *Herculane International Autumn School of Biophysics*, Timișu de Sus – Predeal, Románia, 2003. (poszter)

Székely A., Rubovszky B., Krasznai Z.: Egyes zsírsavak eltérően módosítják a humán perifériás limfociták $K_v1.3$ csatornáinak kinetikáját. *XXXIII. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2003. (poszter)

Székely A., Fórizs F., Rubovszky B., Márián T., Krasznai Z.: Adenozin-analógok dózisfüggően módosítják a DDT_1 MF-2 simaizom-sejtek káliumcsatornáinak működését. *XXXII. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2002. (poszter)

Székely A., Fórizs F., Rubovszky B., Márián T., Krasznai Z.: Az A_1 és A_2 adenozinreceptor-aktiváció ellentétes hatása DDT_1 MF-2 simaizom-sejtek membránpotenciáljára. *III. Sejtanalitikai konferencia*, Budapest, 2002. (poszter)

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: Effect of P_1 type adenosine receptor agonists on the potassium currents of DDT_1 MF-2 smooth muscle cells. *Summer School National Conference of Romanian Society for Pure and Applied Biophysics*, Sovata, Románia, 2001. (poszter)

Székely A., Márián T., Rubovszky B., Krasznai Z.: Adenosine analogues modify potassium channel properties of DDT_1 MF-2 cells in a dose-dependent manner. *Summer School National Conference of Romanian Society for Pure and Applied Biophysics*, Sovata, Románia, 2001. (poszter)

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: Effect of P₁ type adenosine receptor agonists on the potassium currents of DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Orvosi és gyógyszerészeti szemle* **47.** (3), 8. (2001) (megjelent absztrakt)

Székely A., Márián T., Rubovszky B., Krasznai Z.: Adenosine analogues modify potassium channel properties of DDT₁ MF-2 cells in a dose-dependent manner. *Orvosi és gyógyszerészeti szemle* **47.** (3), 9-10. (2001) (megjelent absztrakt)

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: P₁ típusú adenosinreceptor-agonista NECA és fluorral jelölt származéka, a ¹⁹F-NECA hatása DDT₁ MF-2 sejtek káliumáramaira. XXXI. *Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2001. (poszter)

10.4. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások

Székely A., Kitajka K., Krasznai Z.: A humán perifériás limfociták K_v1.3 csatornáinak kinetikája és membránjának összetétele egyes zsírsavak hatására megváltozik. XXXIV. *Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2004.

Székely A.: Zsírsavak módosítják a humán perifériás limfociták K_v1.3 csatornáinak kinetikáját. *PhD konferencia*, Debrecen, 2003.

Székely A.: Adenosin-analógok dóziszfüggően módosítják a DDT₁ MF-2 sejtek káliumcsatornáinak működését. *PhD konferencia*, Debrecen, 2002.

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: P₁ típusú adenosinreceptor-agonista NECA és fluorral jelölt származéka, a ¹⁹F-NECA hatása DDT₁ MF-2 sejtek káliumáramaira. XXXI. *Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2001.

10.5. Egyéb poszter

Kiss, T., **Székely, A.**, Somsák, L. and Kiss, L.: Synthesis of xilosidase inhibitors and their enzymatic investigations using β-D-xilosidase from *Aspergillus carbonarius*. 20th *International Carbohydrate Symposium*, Hamburg, Németország, 2000. (poszter)

10.6. Egyéb előadások

Lévai, A., Patonay, T., **Székely, A.** and Vass, E. B.: Enantioselective epoxidation of 3-substituted and 2,3-disubstituted chromones. *17th International Congress of Heterocyclic Chemistry*, Vienna, Ausztria, 1999.

Lévai, A., Patonay, T., **Székely, A.** and Vass, E. B.: Comparative epoxidation of 3-substituted and 2,3-disubstituted chromones. *11th European Symposium on Organic Chemistry*, Göteborg, Svédország, 1999.

Lévai A., Patonay T., **Székely A.**, Vass E.: Kromonok összehasonlító epoxidálása. *A MTA Heterociklusos Kémiai Munkabizottsága 1999. évi előadóülése*, 1999.

Székely A.: 3-Szubsztituált és 2,3-diszubsztituált kromonok epoxidálása. *XXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia*, Veszprém, 1999.

Székely A.: 3-Szubsztituált és 2,3-diszubsztituált kromonok epoxidálása, *TDK konferencia*, Debrecen, 1998.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Gáspár Rezső egyetemi tanárnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi igazgatójának és Prof. Damjanovich Sándor akadémikus egyetemi tanárnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet korábbi igazgatójának, hogy lehetővé tették és támogatták, hogy munkámat intézetükben végezhessem el, továbbá biztosították számomra a folyamatos szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Krasznai Zoltán egyetemi docensnek a témaválasztásért, valamint hogy munkámat koordinálta és szakmailag hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönet illeti Dr. Panyi György egyetemi docenst munkám során nyújtott segítségéért, tanácsaiért.

Köszönöm dr. Somodi Sándornak és Dr. Hajdú Péternek a patch-clamp mérések kivitelezéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket.

Köszönöm Harangi Istvánnénak a sejttenyésztéshez nyújtott segítségét.

Továbbá köszönetet mondok a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik e disszertáció elkészülésében segítségemre voltak, szobatársaimnak, hogy munkámhoz kellemes, baráti légkört teremtettek.