

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A Kv1.3 ioncsatornák szterolok általi szabályozásának vizsgálata  
*in vitro* és *ex vivo* rendszerekben**

**Dr. Balajthy András**

**Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2016**

**A Kv1.3 ioncsatornák szterolok általi szabályozásának vizsgálata *in vitro* és *ex vivo* rendszerekben**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Balajthy András okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora  
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet  
(Diskussziós terem, 2.209-2.211)  
2016. október 13. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora  
Dr. Dienes Beatrix, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora  
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora  
Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora  
Dr. Dienes Beatrix, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”  
épület tanterme, 2016. október 13. 13:00 óra

# **I. BEVEZETÉS**

## **I.1. Az ioncsatornákról általánosságban**

Az ioncsatornák pórusformáló transzmembrán fehérjék, feladatuk az ionok elektrokémiai gradiensnek megfelelő, passzív transzportja a sejtmembránon keresztül. Három alapvető tulajdonságuk a kapuzás, a szelektív permeabilitás és a vezetőképesség. A kapuzás alatt a csatornák megfelelő „inger” hatására végbemenő konformációváltozását értjük, melyek a csatorna eltérő funkcionális (vezető, nem vezető) és szerkezeti (nyitott, zárt, inaktivált) állapotai közti átmenetnek felelnek meg. Az „inger” szerint megkülönböztethetünk feszültség, extracelluláris ligand, intracelluláris szignál, valamint mechanikai feszülés kapuzott csatornákat. Az ioncsatornák szelektíven működnek, azaz egy adott ioncsatorna csak meghatározott ionok transzportjára képes. A szelektivitás alapján beszélhetünk alacsony szelektivitású, magas szelektivitású és nem szelektív csatornákról.

## **I.2. A Kv1.3 ioncsatorna szerkezete, expressziója és élettani funkciója**

A Kv1.3 csatorna négy azonos szerkezetű, nem kovalensen kapcsolódó, egyenként 523 aminosavból álló alegységből felépülő homomer fehérje. Minden alegység hat, kb. 10-20 aminosav hosszúságú  $\alpha$ -helikális transzmembrán szegmensből áll (S1-S6), amit 20-40 aminosav hosszúságú intra- és extracelluláris hurkok kapcsolnak össze. Ezen túl minden alegység rendelkezik egy intracellulárisan elhelyezkedő 94 aminosav hosszúságú C és egy szintén intracelluláris, 184 aminosav hosszúságú N-terminálissal is. Míg a transzmembrán részek nagyfokú rendezettséget mutatnak, addig pl. a rendkívül flexibilis C-terminálishoz nem lehet egyértelmű konformációt rendelni. A Kv1.3 alegységei más Kv alegységekkel kombinálódva (pl. Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5) funkcionális heterotetramer csatornákat is képezhetnek, melyek különböző arányban tartalmazhatják az eltérő Kv alegységeket. A Kv1.3 ioncsatornát először a humán T-sejtek sejtmembránjának transzmembrán fehérjéjeként írták le 1984-ben. Átfogó proteomikai kutatásoknak köszönhetően ismert, hogy fehérje szinten expresszálódik az immunrendszer egyéb sejtjein is (pl. B-sejt, dendritikus sejt), továbbá a központi idegrendszer különböző részeiben (pl. homloklebeny, gerincvelő), hasnyálmirigyben, prosztatában, illetve a gyomor-bél rendszerben is egészséges szövetek esetén. A Kv1.3 ioncsatorna legszélesebb körben kutatott funkciója a T-sejt aktiváció során kialakuló kalciumjel szabályozása a membrán negatív feszültségértéken tartása révén. A Kv1.3 gátlása depolarizálja a T-sejteket, ennek következtében elmarad a sejtek aktivációja és proliferációja, zavart szenved a migráció és csökken az interleukin-2 (IL-2), interferon- $\gamma$

(IFN- $\gamma$ ) termelése. Az aktivált effektor memória sejtek ( $T_{EM}$ ) ioncsatornáinak specifikus expressziós mintázata lehetővé teszi a Kv1.3 ioncsatorna-blokkolók terápiás felhasználását azon autoimmun kórképekben, ahol ez a szubpopuláció felelős a betegség kialakulásáért, mint pl. sclerosis multiplex (SM), reumatoid arthritis (RA), 1-es típusú diabétesz.

### **I.3. A koleszterin szerepe az ioncsatornák működésének szabályozásában**

Az utóbbi években egyre több tanulmány hangsúlyozta a koleszterin szerepét az ioncsatorna-működés szabályozásában. Az ioncsatornák szerkezeti és funkcióbeli sokszínűsége miatt azonban a koleszterin eltérő módon befolyásolja a különböző csatornák működését. Míg a koleszterinszint növelésének legáltalánosabb hatása a csatornák aktivitásának (nyitási valószínűség, vezetőképesség) koncentrációfüggő csökkenése, melyet számos  $K^+$  csatorna mellett feszültségfüggő  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$  csatornára is kimutattak, addig a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák esetében a koleszterin kivonása a membránból gátolta a csatornák működését. Más csatornák esetében a koleszterin a kinetikai és egyensúlyi aktivációs paraméterekre van hatással.

A koleszterin ioncsatornákra kifejtett hatását két eltérő elmélettel magyarázzák. Az első a koleszterin és az ioncsatornák direkt és specifikus lipid-fehérje kölcsönhatását valószínűsíti. A koleszterin részt vesz annak a lipidekből álló „övnek” vagy „buroknak” a kialakításában, ami közvetlenül az ioncsatorna körül helyezkedik el. Az övet alkotó lipid molekulák kapcsolatba kerülnek az ioncsatornák transzmembrán héliceinek sejtmembránnal határos régióival, melyek a lehetséges lipid kötő szekvenciákat tartalmazzák. Az elmélet szerint a lipid öv koleszterin koncentrációjának változása a koleszterin és a csatorna ligand-receptor kölcsönhatásainak befolyásolásán keresztül módosíthatja az ioncsatornák konformációját és vezethet a biofizikai paraméterek megváltozásához. A lipid öv betüremkedhet a transzmembrán hélixek találkozásánál kialakuló árkokba, növelve a lipid-fehérje kölcsönhatásokhoz szükséges határfelületek felszínét. A betüremkedéseknek köszönhetően a lipid környezet a transzmembrán domének által határolt pórusra is hatással lehet. Az elmúlt évek kutatásai olyan új kötőhelyekre mutattak rá, melyek nem a klasszikus értelemben vett lipid-fehérje határfelületen helyezkedtek el, hanem az intracelluláris C- vagy N-terminálison.

Több olyan általános koleszterinkötő szekvenciát is azonosítottak, mely alapján feltételezni lehet egy transzmembrán fehérje koleszterinnel szembeni érzékenységét. Ezek közül a legelsőként leírt és legjelentősebbnek tartott a CRAC és CARC szekvencia. A CRAC (cholesterol recognition amino acid consensus motif, koleszterin felismerő aminosav

motívum) szekvencia egy nagyon egyszerű algoritmust követ: az első tagja egy elágazó láncú apoláris aminosav (leucin vagy valin), melyet egy-öt darab tetszőleges aminosav követ, majd egy aromás tirozinon keresztül ismét egy-öt tetszőleges aminosav vezet a szekvenciát záró pozitív töltésű aminosavhoz (lizin, arginin). A CRAC-hoz nagyon hasonló CARC szekvencia az előbbi inverze, ahol a sort egy pozitív aminosav indítja, az aromás aminosav pedig a tirozin mellett fenilalanin is lehet. Az algoritmus egyszerűségéből adódóan CRAC/CARC szekvenciával rendelkező fehérjék szterolérzékenységét megfelelő szkepticizmussal, csupán prediktív jelleggel lehet felhasználni. Azonban nem lehet figyelmen kívül hagyni azokat az eredményeket, ahol e szekvenciák egyszerű pontmutációja vagy delécioja teljesen megváltoztatta a vad-típusú csatorna koleszterin iránti érzékenységet.

Más megközelítésében a koleszterin a sejtmembrán általános fizikai paramétereit megváltoztatva képes az ioncsatornák működésének befolyásolására. A transzmembrán fehérjék és a lipid kettősréteg hidrofób részei eltérő átmérőjének következtében a fehérje pertubálja a környező lipideket, megváltoztatva a kettősréteg vastagságát, rendezettségét. A lipid réteg úgy fog igazodni, hogy lokális vastagsága megegyezzen a transzmembrán fehérje hidrofób szakaszával. Ezen nyugalmi állapot megváltoztatása energiaigényes folyamat. A fehérjék konformációváltozás során deformálják a környező lipid kettősréteget, és minél nagyobb a membrán ellenállása, annál több energia kell ahhoz, hogy a folyamat kivitelezhető legyen. A lipidkörnyezet fizikai paramétereinek változtatása a folyamat energetikai szükségleteit megváltoztatva módosíthatja a molekuláris mozgásokat. A koleszterinmolekulák hatással vannak a membrán fluiditására, vastagságára, permeabilitására, a membránfehérjék laterális diffúziójára, így ezeken keresztül befolyásolhatják az ioncsatornák konformációváltozásának valószínűségét, kinetikai és egyensúlyi jellemzőit. A két modell nem zárja ki egymást, azonban az egyes mechanizmusok szerepe csatornánként eltérő jelentőségű lehet. A két hatás elkülönítése egy adott csatorna esetén kihívás elé állítja a kutatókat. Az elkülönítés egyik lehetséges módszere olyan koleszterin analógok vizsgálatán alapszik, melyek sejtmembrán szerkezetére gyakorolt hatása hasonló a koleszterinhez, azonban a receptor-ligand kölcsönhatások során nem tudja helyettesíteni azt. Az epikoleszterin és ent-koleszterin két olyan királis koleszterin analóg, amelyek kisebb fenntartásokkal ugyan, de megfelelnek a fenti kritériumoknak. Míg a koleszterin csökkenti a Kir2.1 csatorna áramsűrűségét, addig az epikoleszterin növeli azt, specifikus lipid-fehérje kölcsönhatást valószínűsítve. Hasonló koleszterin analógokkal szembeni sztereo-specificitást publikáltak KCa1.1 és TRPV1 (Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1) csatornák esetén,

míg az nAChR (nikotinerg acetilkol receptor) vagy VRAC (volumen regulált anion csatorna) csatornák esetén nem volt eltérés a optikai izomerek és a koleszterin hatásában.

#### **I.4. A koleszterinbioszintézis zavarának prototípusa-Smith Lemli-Opitz szindróma**

Az elmúlt harminc évben több malformációs szindrómáról (Smith-Lemli-Opitz szindróma, lathosterolosis, desmosterolosis) derült ki, hogy a betegség hátterében a szterolszintézis örökletes zavara áll. Ezek közül a legelsőként leírt a Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLOS), mely nevét a betegséget 1964-ben leíró orvosokról kapta. Az SLOS autoszomális recesszíven öröklődő, monogén, malformációs szindróma (McKusick 270400). A szindrómát az endogén koleszterin bioszintézis Kandutsch-Russel útvonalának záró lépését katalizáló 7-dehidrokoleszterin-reduktáz enzim (7DHCR) vele született zavara okozza. Az enzimdefektus a koleszterinszint csökkenése mellett a koleszterinszintézis prekursor molekuláinak (elsődlegesen 7-dehidrokoleszterin (7DHC) és izomere, a 8-dehidrokoleszterin) emelkedett szintjéhez vezet a vérplazmában és a sejtmembránban egyaránt. A folyamat eredményeképpen megváltozik a lipidraftok és a membránok szerveződése, zavart szenvednek különböző szignáltranszdukciós útvonalak, illetve a koleszterin mint univerzális prekursor molekula (epesavak, neuroaktív szteroidok, szteránvázas hormonok) sem tudja maradéktalanul ellátni feladatát. Továbbra is nyitott kérdés azonban, hogy a tünetek kialakulásáért elsődlegesen a koleszterin hiánya vagy a prekursor molekulák toxikus hatása tehető felelőssé.

A betegség tünettana és megjelenése szerteágazó, az arc és a fej-nyak régió gyakori fejlődési rendellenességei és neurológiai eltérések mellett szinte minden szervrendszer érintett lehet. A betegséget eredetileg a klinikai fenotípus, az együttesen fenálló arcdysmorphia, microcephalia, hypospadiasis és szomatomentális retardáció alapján írta le Smith, Lemli és Opitz. Az SLOS-re jellemző jegyek mellett a súlynövekedés elmaradása és táplálási nehézségek hívhatják fel a kezelőorvos figyelmét a betegségre. Gyakoriak a légzőrendszer különböző bakteriális és virális fertőzései, melyek hátterében inkább másodlagos tényezők (a fej-nyak régió anatómiai elváltozásai, betegek immobilitása, légzési segédizmok hypotóniája) állhatnak, mintsem a betegséghez társuló immunszuppresszió. A klinikai tünetek alapján felmerülő SLOS gyanút a szérumban koleszterin csökkenése és emelkedett 7DHC szint igazolhatja, további bizonyítást a molekuláris genetikai vizsgálat ad. A 7DHCR több mint 130 különböző mutációját azonosították eddig, de a genotípus-fenotípus között nincs szoros összefüggés, azaz ugyanazon mutáció vezethet enyhe vagy súlyos rendellenességhez is. A betegek súlyosság szerinti besorolása a fenotípus jegyeket alapul vevő, Kelley és Hennekam által módosított Bialer pontrendszer segítségével történik. A betegség kezelésére jelenleg csak tüneti terápia áll

rendelkezésre. Orális koleszterin szubsztitúció hatására a viselkedési problémák és a hallásfunkciók javulását, a fényérzékenység és a fertőzések csökkenését tapasztalták. Antioxidáns kezelés, valamint statin terápia a szterol prekursorok toxicitásának mérséklésén keresztül lehet hatásos. A kezelések hatásosságáról megoszlanak a vélemények, ugyanis a randomizált, placebo kontrollált klinikai tanulmányok vagy hiányoznak, vagy nem támasztják alá a nem standardizált tanulmányokban talált eltéréseket. Az első magyarországi SLOS beteget 2002-ben diagnosztizálták, ezt követően további 14 beteg került felismerésre. A magyarországi betegek többségét a Debreceni Egyetem Gyermekgyógyászati Klinikájának laboratóriumában diagnosztizálták a klinikai gyanú felmerülését követően szérumban 7DHC-koncentráció meghatározásával. 2014-ben a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben a magyarországi betegek gondozására SLO-szindróma diagnosztikai és terápiás munkacsoportot alakítottak ki. A munkacsoport részletesen feltérképezte az általuk gondozott betegek klinikai, biokémiai és genetikai jellemzőit és elsőként írta le a 7DHCR egy újonnan felismert mutációját. Egyelőre nincs adat a betegség magyarországi incidenciájáról, de a becsült értékek (1:10000-1:70000, egy friss kutatás 1:39125) a kórkép jelentős aluldiagnosztizáltságára utal. Az általam vizsgált minták a korábban diagnosztizált magyarországi betegektől származtak.

### **I.5. Hiperkoleszterinémia és annak immunológiai vonatkozásai**

A koleszterinnel kapcsolatos betegségek másik, széles körben is ismert spektrumát a zsírsanyagcsere koleszterinszint-emelkedéssel járó zavarai képviselik. A hiperlipidémiák során kialakuló hiperkoleszterinémia (HC) csak tünet, melynek hátterében 3 fő ok állhat: a kedvezőtlen étrend és életmód által kiváltott anyagcsere-túlterhelés, betegségek vagy gyógyszerek hatására kialakuló szekunder anyagcserezavarok, valamint a zsírsanyagcsere primer, örökletes zavarai. A koleszterin mellett természetesen más lipidek és lipoproteinek koncentrációja is megváltozik, így az eltérések felosztása az etológia mellett történhet a lipoproteinek koncentrációját figyelembe vevő Fredrickson-féle beosztás, vagy a triglicerid és koleszterinszint meghatározása alapján is. A hiperkoleszterinémia következménye az etiológiától, beosztástól függetlenül szisztémás érlemezés és következményes szívinfarktus, agyi infarktus vagy perifériás érelzáródás lehet. A hiperlipidémiák sikeres kezelésének alapját a megfelelő diéta és életmódváltás jelentheti, mely legtöbb esetben kiegészül a koleszterin bioszintézis kulcsenzimét, a hydroxymetil-glutanyl-CoA-t (HMGCoA) szelektíven gátló statin készítmények alkalmazásával. A hiperlipidémiák népegészségügyi jelentőségét nem lehet eléggé hangsúlyozni, a jóléti társadalmakban a felnőtt populáció több mint 50 százalékának kóros a lipid profilja, a társuló betegségek pedig jelentősen terhelik az egészségügyi ellátó rendszert. Habár az utóbbi években

némi javulás volt tapasztalható, a kardiovaszkuláris halálozás még mindig első helyen áll Magyarországon.

Az elmúlt évek során intenzív alapkutatások zajlottak az érlemeszesedés patogenezisének, molekuláris és sejtszintű történéseinek feltárására. A jelenleg legelfogadottabb hipotézis szerint az érlemeszesedés az endotél sejtek különböző eredetű (mechanikai stressz, anyagcsere betegségek, fertőzések, dohányzás) károsodására adott krónikus gyulladásos válaszreakciója, mely fenntartásában kiemelt szerepet játszanak az érfalba lerakódó lipid (köztük koleszterin) molekulák. A károsodott endotél által termelt gyulladásos faktorok aktiválják a veleszületett és a szerzett immunrendszer sejtjeit, melyek az osztódó simaizomsejtekkel közösen vesznek részt a főleg koleszterinnel telített ateroszklerotikus plakkok kialakításában. A plakk nemcsak elzárhatja az ereket, de a leszakadó törmelékek mikroembóliákat okozhatnak, a plakk alatti meggyengült érfalban pedig gyakran alakul ki aneurisma, melynek megrepedése súlyos vérzéssel járhat. Úgy tűnik, hogy a T-sejtek kiemelt szerepet játszanak az érlemeszesedés gyulladásos folyamataiban. Érlemeszesedésben szenvedő betegek és modellállatok vizsgálata egyaránt alátámasztotta az aktivált T-sejtek jelenlétét az ateroszklerotikus plakkokban. A T-sejtek jelentős része oxidált LDL partikulumokra volt specifikus. Hiperlipidémiás állatmodellekben a  $CD4^+$  limfociták depléciója csökkentette az érlemeszesedés progresszióját, immunhiányos SCID egerekben az immunológiai funkciók helyreállítása viszont felgyorsította a folyamatot. Fontos észrevétel, hogy az érlemeszesedéshez vezető állapotok befolyásolják az immunrendszer normál működését is, többnyire csökkentve a szervezet ellenálló képességét különböző kórokozókkal szemben. Hiperkoleszterinémia hatására megemelkedik a limfociták sejtmembránjának koleszterintartalma. A mesterségesen előidézett hiperkoleszterinémia állatkísérletekben negatívan befolyásolta a Kv ioncsatornák által ellátott élettani funkciókat. Legjobb tudásunk szerint munkacsoportunk publikálta először az emelkedett hiperkoleszterinémia hatását humán mintákból izolált limfociták Kv1.3 csatornái esetén

## II. CÉLKITŰZÉSEK, VIZSGÁLT KÉRDÉSEK

Az elmúlt évek során számos olyan tanulmány látott napvilágot ahol a koleszterint az ioncsatornák működésének fontos szabályzójaként jellemezték. Ezen tanulmányokban általában *in vitro* módszerekkel (pl. ciklodextrin-koleszterin zárványkompleksszel) módosították a membrán koleszterintartalmát, majd vizsgálták a megváltozott membránkörnyezet hatását az ioncsatornák működésére. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az *in vitro* megnövelt koleszterinszint módosítja az egészséges donorokból

izolált limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak kapuzását. Az aktivációs és inaktivációs kinetika lelassult, a csatorna egyensúlyi aktivációja pedig a pozitívabb membránpotenciálok felé tolódott el a kezelés hatására. Hasonló változásokat írtak le egyéb kálium ioncsatornák vizsgálata során is. Jelen munkánk egyik alapkérdése az, hogy a szterolok *in vitro* kísérletekben talált módosító szerepének van-e valódi biológiai jelentősége? Előfordulhat-e olyan betegség/kórállapot, ahol a sejtmembrán megváltozott koleszterintartalma befolyásolja az ioncsatornák működését? Ennek megválaszolására a koleszterinhomeosztázist jelentősen, de eltérő módon befolyásoló (koleszterinszintézis zavara, illetve hiperkoleszterinémia) betegségek ioncsatornákra és T-sejtek működésére gyakorolt hatását vizsgáltuk meg perifériás vérből izolált T-sejteken. A Kv1.3 ioncsatorna C-terminálisának funkciójáról kevés információ van. Hipotézisünk szerint a Kv1.3 C-terminálisa más ioncsatornákhöz hasonlóan (pl. P2X7 és BK csatornák) részt vehet a csatorna szterollokkal történő interakciójában. A Kv1.3 aminosav szekvenciáját vizsgálva több CARC koleszterinfelismerő motívumot térképeztünk fel a Kv1.3 C-terminálisán. Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk a Kv1.3 C-terminálisának szerepét a szterollokkal történő interakciókban.

Munkánkat az alábbi konkrét célkitűzések mentén folytattuk:

- I. Hiperkoleszterinémiás és Smith-Lemli-Optiz szindrómás betegekből izolált sejtek koleszterintartalmának, illetve szterolprofiljának vizsgálata.
- II. Kv1.3 ioncsatornák kapuzásának vizsgálata hiperkoleszterinémiás és Smith-Lemli-Optiz szindrómás betegekből izolált limfociták esetén.
- III. Vizsgálni kívántuk ezekben a kórállapotokban a membránkoleszterin *in vivo* megváltozott összetételének hatását a T-limfocita ioncsatornák által szabályozott funkcióira (aktiváció, proliferáció).
- IV. A SLOS szindrómára jellemző membrán 7DHC tartalom modellezése egészséges donorokból izolált limfociták esetén.
- V. Kv1.3 ioncsatornák biofizikai jellemzőinek vizsgálata SLOS modellrendszerben.
- VI. A koleszterin és a 7DHC Kv1.3 ioncsatornára gyakorolt hatásának összehasonlítása.
- VII. A C-terminálisától megfosztott Kv1.3 ioncsatorna koleszterin/7-DHC-érzékenységének vizsgálata.
- VIII. A Kv1.3 C-terminálisán található CARC szekvenciák pontmutációival előállított mutáns csatornák koleszterinérzékenységének vizsgálata.

### **III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **III.1. Oldatok, vegyszerek**

A kísérletekben felhasznált oldatok és vegyszerek jelentős részét a Sigma Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) vásároltuk, minden ellenkező esetben az anyag mellett feltüntettük a forrását.

#### **III.2. Mintagyűjtés, csoportba rendezés**

##### *III.2.1. Hiperkoleszterinémia*

A kísérletek során 15, korábban nem kezelt, a Friderickson szerinti besorolás alapján II/A; II/B csoportba tartozó hiperkoleszterinémiás személyt vizsgáltunk. A mintagyűjtés során arra törekedtünk, hogy a mintaadók teljes koleszterinszintje a fiziológiás  $<5,2$  mmol/l értéknél magasabb legyen. Mivel ezen értékek nagysága tág határok között mozgott a megfigyelt populációban, a hiperkoleszterinémiás mintákat a koleszterinszintek alapján két csoportra bontottuk. Az első csoportba (HC I. csoport) a mérsékelten ( $5,2 \text{ mmol/l} < X < 10 \text{ mmol/l}$ ), a második csoportba (HC II. csoport) a jelentősen ( $10 \text{ mmol/l} < X$ ) emelkedett koleszterinszinttel rendelkező személyek mintái kerültek.

##### *III.2.2. Smith-Lemli-Opitz szindróma*

Tanulmányunkba a kilenc elérhető magyarországi betegből 8-at sikerült bevonni (életkor:  $7.65 \pm 2.23$  év), egy gyermek ugyanis külföldön tartózkodott. A mintavételezés során 8 egészséges, az SLOS betegek életkorához igazított kontroll személyt (életkor:  $7.66 \pm 1.83$  év) is bevontunk a tanulmányba. A betegektől és egészséges kontroll személyektől egyenként 10 ml perifériás vért vettünk heparinizált vákumos csövekbe.

#### **III.3. Sejtek, sejtvonalak**

##### *III.3.1. Mononukleáris sejtek szeparálása*

A vérmintákból Ficoll-Hypaque sűrűség gradiens centrifugálással nyertünk mononukleáris sejteket, majd kétszer mostuk őket  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Mg}^{2+}$ -mentes 25 mM HEPES-t tartalmazó Hank oldatban. A sejtek felét ezután lefagyasztottuk  $-80^\circ\text{C}$ -ra és ott tároltuk az elektrofiziológiai vizsgálatok elvégzéséig. A proliferációs kísérleteket frissen izolált sejtek felhasználásával végeztük.

### *III.3.2. CHO (Chinese Hamster Ovary) sejtvonala*

A kínai hörcsög petefészkéből izolált sejtvonalat (CHO) magas glükóz (4500 mg/ml), 10% FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/ml penicilin-G, és 100 µg/ml streptomycin tartalmú Dulbecco féle minimum esszenciális (DMEM) tápoldatban tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 95%-os páratartalom mellett. A sejteket hetente háromszor passzáltuk. Az mGFP Kv1.3 WT és mGFP ΔCKv1.3 konstrukciókat munkacsoportunk munkatársa, Dr. Szilágyi Orsolya hozta létre retrovirális transzdukciós módszerrel.

### **III.4. Koleszterin és 7-dehidrokoleszterin töltés**

A frissen izolált limfocitákat illetve CHO sejteket kétszer mostuk Hanks oldattal, majd  $2 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban felfuszpendáltuk metil-β-ciklodextrin/koleszterin-t (MβCD/CHOL, CycloLab Cyclodextrin Research and Development Laboratory Ltd., Hungary) vagy metil-β-ciklodextrin/7-dehidrokoleszterin-t (MβCD/7DHC CycloLab Cyclodextrin Research and Development Laboratory Ltd., Hungary) tartalmazó Hanks oldatba. A sejtuszupenziót 60 percig 37°C-on inkubáltuk, majd kétszer mostuk Hanks oldatban, végül ez elektrofiziológiai mérések során külső oldatként alkalmazott normál extracelluláris oldatban vettük fel a sejteket. A kontroll sejtek esetében ciklodextrin származékok nélkül inkubáltuk a sejteket.

### **III.5. A sejtek koleszterin illetve 7DHC összetételének meghatározása**

#### *III.5.1. Amplex Red Cholesterol Assay Kit*

A hiperkoleszterinémiás sejtek koleszterintartalmának meghatározását az Amplex Red Cholesterol Assay segítségével végeztük a gyártó utasításait követve (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham). A mérésekhez Multimode Microplate Reader-t (BioTek, Winooski, VT) használtunk.

#### *III.5.2. Gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS)*

Az SLOS betegekből származó vörösvértestek (vvt) CHOL és 7DHC koncentrációjának meghatározásához gázkromatográfia-tömegspektrometrián (GCMS-QP2010, Shimadzu) alapuló módszert alkalmaztunk. A kísérleteket Dr. Péter Mária az SZBK munkatársa végezte. Az egyes szterolok azonosítása koleszterin és 7DHC referencia oldatok segítségével történt.

### III.6. Limfocita aktiváció, proliferáció vizsgálata

#### III.6.1. CD154 expresszió vizsgálata

A CD154 (CD40 ligand) egy korai, kalciumfüggő T-sejt aktivációs marker. Expressziójának vizsgálatához az SLOS és kontroll sejteket tartalmazó mintákat 1  $\mu$ M thapsigarginnal aktiváltuk 3 órán keresztül, 37 °C-on, majd 5% FCS/PBS-ben mostuk a sejteket háromszor. Ezután phycoerythrinnel (PE) konjugált egér anti-CD3 és Alexa 488 konjugált egér anti-CD-154 antitestekkel jelöltük a sejteket 20 percig, szobahőmérsékleten, a gyártó utasításait követve. A kontroll mintákhoz a fent említett antitest (CD3) izotípus kontrollját adtuk. Az inkubációt követően háromszor mostuk a sejteket 5% FCS/PBS-ben. A jelölést követően BD FACScan (Beckton-Dickinson, New Jersey, USA) citométerrel vizsgáltuk a mintákat. Minden esetben legalább 10000 CD3<sup>+</sup> T-sejt CD154 expresszióját értékeltük ki FCS Express 4 szoftver (De Novo Software, Glendale, USA) segítségével.

#### III.6.2. Karboxifluoreszcein-szukcinimidil-észter (CFSE) hígulási esszé

A T limfociták proliferációjának vizsgálatához a Lyons és mtsai. által kidolgozott CFSE-hígulási esszé munkacsoportunk által módosított változatát használtuk. A perifériás vérből frissen szeparált mononukleáris sejtekhez 1  $\mu$ M-os végkoncentrációban adtuk a CFSE-t majd inkubáltuk a sejtszuszpenziót 15 percig szobahőmérsékleten és 20 percig 37 °C-on. A limfociták szelektív aktivációjához 500ng/ml anti-CD3 és 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 szolúbilis antitesteket használtunk, mely hatására a sejtek átlagosan naponta-kétnaponta osztódtak. A CFSE-vel jelölt sejtek proliferációját a stimulációt követő ötödik napon vizsgáltuk FACScan típusú citométert segítségével (a CFSE gerjesztési maximuma 488nm, illetve emissziós maximuma 520 nm saját spektrofotometriás mérés, illetve irodalmi alapok alapján). Köpenyfoliadékként egyszeres PBS-t használtunk. A vizsgált sejtek száma tenyésztedény lyukakként 100 000 volt. Három paramétert mértünk: az előreszórást (FSC), az oldalszórást (SSC), illetve a sejtekben a CFSE által emittált fluoreszcencia intenzitást. Az FSC és SSC értékek alapján kaput illesztettünk a T-limfocitákra, majd a kapu által határolt populációnak vizsgáltuk meg a CFSE fluoreszcencia-hisztogramját. A proliferáció mértékét az osztódások során létrejött utódsejtek és az összes sejt számának hányadosaként definiált osztódási indexszel (OI) jellemeztük, az alábbi képlet segítségével:

$$OI = \left( \sum_{k=1}^n A_k \right) / \left( \sum_{k=0}^n A_k \right)$$

ahol az n darab osztódási ciklus alatt a k ciklusban A<sub>k</sub> darab sejt volt a mintában.

### III.7. Elektrofiziológia

A mérések során személyi számítógéphez Digidata 1440 és 1322A A/D konverter segítségével kapcsolt Axopatch-200A és Axopatch-200B erősítőket alkalmaztunk (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A sejteket Nikon TE2000U vagy TS100 mikroszkóp alatt azonosítottuk, a mérőelektrodát a mikropipettával Burleigh PCS-PS60 mikromanipulátor segítségével irányítottuk a sejtekhez. Az adatok felvételéhez és kiértékeléséhez pClamp10 szoftercsomagot használtunk (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Az elektrofiziológiai mérések során a CD4<sup>+</sup> T-sejtek szelekcióját Matteson és Deutsch után a következőképpen végeztük: a sejteket egér anti-humán CD4 (0.5 µg/10<sup>6</sup> cells, AMAC, Westbrook) antitestekkel inkubáltuk olyan speciális Petri-csészékben melyek aljához korábban kecskében az egér IgG (Biosource, Camarillo, CA) ellen termeltetett antitesteket kötöttünk ki. A mérések előtt a Petri-csészéket öt alkalommal mostuk normál extracelluláris oldattal. A mérések során felhasznált pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark Biomedical Instruments, Pangbourne, UK) üvegkapillárisokból húztuk négy fázisban, majd hő segítségével políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál intra- és extracelluláris oldat esetén 3–6 MΩ volt, outside-out konfiguráció esetén 5-7 MΩ. Az elektrofiziológiai mérések során az extracelluláris vagy más néven külső oldat összetétele a következő volt: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES (pH 7,35, 305 mOsm), míg a pipetában lévő belső oldat: 140 mM KF, 11 mM K<sub>2</sub>EGTA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> és 10 mM HEPES (pH 7,20, 295 mOsm) volt. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (22-24 °C) végeztük. A Kv1.3 expresszióját közvetett módon, az áramsűrűség ( $J_{Kv1.3}$ ) kiszámításával számszerűsítettük. Az egységnyi felületegységre eső csatornaszámmal arányos áramsűrűséget a +50 mV-os depolarizáció során mért csúcsáram ( $I_{max}$ ) és a teljes-sejt kapacitás ( $C_m$ ) hányadosaként definiáltuk. Ennek megfelelően a sejteket a kezdeti -120mV-os tartó feszültségről +50mV-ra depolarizáltuk, 15 ms hosszan, 30 mp-enként. Minden sejt esetében legalább három egymás utáni depolarizáló impulzus során kapott áramgörbe amplitúdójának átlagát tekintettük a csúcsáramnak. A sejtek kapacitását a pClamp10 szoftver segítségével határoztuk meg, manuális korrekciót követően. A Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kinetikájának vizsgálatához a sejteket a -120mV-os tartófeszültségről +50mV-ra depolarizáltuk 15 ms hosszan, az impulzusokat 15 másodpercenként ismételtük meg. A kapott áramgörbéket a pClamp10 szoftver felhasználásával, Hodgkin és Huxley alapján, az úgynevezett n<sup>4</sup>-es modellel illesztettük:  $I(t) = I_a \times (1 - \exp(-t/\tau_a))^4 + C$ , ahol  $I(t)$  a t-időpontban mérhető áram,  $I_a$  a protokoll során mért áram amplitúdója,  $\tau_a$  az aktivációs kinetikát jellemző időállandó,  $C$  pedig

a -120 mV-on mért áram nagysága. Minden sejt esetében legalább három egymást követő depolarizáló impulzust alkalmaztunk, majd a kapott áramgörbék közül az illesztés után a pClamp10 segítségével meghatároztuk az aktivációs időállandók ( $\tau_a$ ) átlagát. A Kv1.3 ioncsatornák inaktivációjának meghatározása során -120 mV-os tartófeszültségről +40 mV-ra depolarizáltuk a sejteket két másodperc hosszan. A csatornák gyors aktiválódása után a Kv1.3 csatornára jellemző lassú, úgynevezett C-típusú inaktiváció volt megfigyelhető. A mérés során kapott áramgörbék lezáró szarát egy-exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illesztettük:  $I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_i) + C$ , ahol  $I(t)$  az illesztés kezdetétől számított  $t$  időpontban mérhető áramerősség,  $I_0$  az inaktiválódó komponens amplitúdója,  $\tau_i$  az inaktivációs időállandó,  $C$  pedig az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága a depolarizáció végén. Az egyedi sejtre jellemző inaktivációs időállandó meghatározása során minden sejt esetében legalább három depolarizáló impulzust alkalmaztunk 60 másodpercenként, majd az egyes áramregiszterek illesztése során kapott inaktivációs időállandókat átlagoltuk. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését az alábbi módon karakterizáltuk: a sejteket a -120 mV-os tartófeszültségről egyre pozitívabb tesztpotenciálokra depolarizáltuk, -70 mV-tól +40 mV-ig, 10 mV nagyságú lépésközöket alkalmazva (ún. I-V görbe). A depolarizáló impulzusok hosszát egyre csökkentettük, ugyanis a depolarizációs feszültség növelésekor az áram aktivációjának gyorsulása miatt a teljes-sejt áram rövidebb idő alatt éri el a maximális értékét. Ezt követően az egyes tesztpotenciálokra kapott maximális áramértékekből az alábbi összefüggés alapján számoltuk ki a teljes-sejt konduktanciát:  $G(V) = I_{\max}/(V - E_{\text{rev}})$ , ahol a  $G(V)$  a  $V$  tesztpotenciálon mért teljes-sejt konduktancia,  $I_{\max}$  az adott tesztpotenciálon mért csúcsáram,  $V$  a tesztpotenciál,  $E_{\text{rev}}$  pedig a Nernst egyenletből számított  $K^+$  egyensúlyi potenciál (-85 mV). A kapott  $G$  értékeket normáltuk a maximális konduktancia értékre, majd ábrázoltuk a tesztpotenciál függvényében, így kapva meg a normált konduktancia-tesztfeszültség függvényt (ún. G-V görbe). Az adatpontokra Boltzmann-függvényt illesztettünk:  $G_N = 1/(1 + \exp[-(V - V_{1/2})/k])$  ahol  $G_N$  a normált konduktancia,  $V$  az aktuális tesztpotenciál,  $V_{1/2}$  a félaktivációs feszültség,  $k$  pedig az aktiváció feszültségfüggésének meredeksége. Az egyensúlyi aktivációt a félaktivációs feszültség és a meredekség meghatározásával jellemeztük.

### **III.8. Flanking primer mutagenesis**

#### *III.8.1. A flanking primer mutagenesis módszer ismertetése*

A mutáns Kv1.3 csatornákat a flanking-primer mutagenesis technika laborunkban optimalizált változatával hoztuk létre.

### III.8.2. PCR reakció

A PCR reakciók során Phusion High-Fidelity DNA Polymerase-t (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham) használtunk a gyártó utasításait követve. Az alábbi primereket használtuk a mutációk létrehozásához:

Belső primer párok a CARC4 kötőhely esetén:

szensz primer:

5'GCGGTATCGGAGGCTGCGTGAGTCTCAGCTCAATGAGGA

antiszensz primer:

5'GCGTCGGAGGCTATGGCGATCGAAGAGGGGGGTATGAAC

Belső primer párok a CARC5 kötőhely esetén:

szensz primer:

5' AGCATCGGTGGCTATCGCTGCGATGTTGACACAAGAGTTGGG

antiszensz primer:

5' GCAGCGATAGCCACCGATGCTTAAGCGGCCGGAATTCTGCAGTC

A külső primer pár szekvenciái, kiemelve az Eco91I illetve EcoR1 restrikciós enzimek hasítóhelyei:

szensz primer:

5'- CAGTGGTAACCATGACAACAGTGGGTTACGGC

antiszensz primer:

5'-CGCGAATTCCCTTAAACATCGGTGAATATC

### III.8.3. Gélelektroforézis

A PCR reakció során keletkezett DNS termékeket 1%-os agaróz gélben futtatuk meg, melyhez 0.5 µg/ml etídium bromidot adtunk. A mintákat 6x töltő pufferral jelöltük, majd felvittük a 1x TAE-ban inkubálódó agaróz gélre. Kontrollként 1 kb DNS létrát alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham). 30 percen keresztül, 100V-on futattuk a mintákat, majd alacsony intenzitású UV megvilágítás alatt kivágtuk a felamplifikált DNS fragmentumokat.

#### *III.8.4. DNS extrakció és tisztítás*

A DNS extrakcióhoz hagyományos fenol extrakciós módszert alkalmaztunk.

#### *III.8.5. Restrikciós enzim hasítás*

Az EcoR1(GAATT↓C) és Eco91I (G↓GTAACC) restrikciós enzimeket a gyártó utasításait követve használtuk (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA).

#### *III.8.6. Ligálás, transzformálás, plazmid preparálás*

Ligálás során T4 DNA Ligase enzimet használtuk a gyártó utasításai alapján. A plazmid-inzert arány 1:5 volt (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA). A transzformáláshoz E. Coli (ET12567) kompetens sejteket használtunk. A plazmidokat felszuszpendáltuk 200 µl kompetens sejteket tartalmazó oldatban, majd 20 percig inkubáltuk őket jégen. 1 perces 42 °C-os hő sokkot követően 2 percre ismét jégre helyeztük a mintákat. Ezt követően 800 µl SOC médiumot adtunk a sejtekhez és 200 rpm-en, 37 °C-on rázattuk őket 45 percig. Időközben elkészítettük a 10ml LB agart (10 g/l tryptone, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 1.5% agar, pH 7.0) és 50 µg/ml kanamycint tartalmazó tenyésztő lemezeket. A rázatást követően a transzformált sejteket lecentrifugáltuk 4000 rpm-en, majd 200 µl SOC oldatba vettük fel és szélesztettük őket a tenyésztő lemezekre. A lemezeket 37 °C-on inkubáltuk 12-18 órán keresztül. A transzformált baktériumok egy-egy telepét 5ml, 50 µg/ml kanamycin tartalmú folyékony LB médiumba oltottuk le, majd 12-18 órán át rázattuk, 200 rpm-en, 37°C-on. A plazmid DNS kinyeréséhez a PureYield Plasmid Miniprep System-et (Promega Corporation, USA) használtuk a gyártó utasításait követve.

### **III.9. Statisztika**

Az eredmények statisztikai összehasonlítását Student-féle t-tesztel (normális eloszlás esetén) vagy Mann-Whitney-próbával (nem normális eloszlás esetén) végeztük. Több mint két minta összehasonlítása során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk Holm-Sidak post hoc analízissel. A mérési eredmények feltüntetése során minden esetben az átlagértékeket és azok közepes hibáját (SEM) adtuk meg, n>4 független mérésre.

## **IV. EREDMÉNYEK**

### **IV.1. A limfociták koleszterintartalmának vizsgálata hiperkoleszterinémiában**

Korábbi irodalmi adatok alapján ismert, hogy hiperkoleszterinémia esetén megemelkedik a T-sejtek koleszterintartalma. Hipotézisünk szerint az emelkedett

koleszterintartalom esetén a membrán koleszterin tartalom is emelkedik, ami módosíthatja a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák működését is. A korábbi eredmények megerősítése érdekében első lépésként összehasonlítottuk az egészséges donorokból illetve hiperkoleszterinémiás betegekből származó limfociták koleszterintartalmát. Pozitív kontrollként normokoleszterinémiás sejteket töltöttünk 215 $\mu$ M M $\beta$ CD/CHOL segítségével. A koleszterintartalom meghatározásához Amplex-Red esszét használtuk fel. A koleszterin koncentráció meghatározása során kapott értékeket a 280 nm-en mérhető abszorbanciára normáltuk. Ezen a hullámhosszon mért abszorbancia arányos a mintában található fehérje (és a sejtek) mennyiségével, ami lehetővé teszi, hogy a normálás utáni mérési eredmények a sejtszámtól függetlenek legyenek. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a hiperkoleszterinémiás betegekből izolált sejtek koleszterin koncentrációja szignifikánsan magasabb, mint a kontroll sejteké (kontroll:  $0,66 \pm 0,009 \mu\text{g/ml}$ ,  $n=3$ , HC I. csoport:  $0,91 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ ,  $n=3$ ,  $p=0,007$ ). Azonban a 215 $\mu$ M M $\beta$ CD/CHOL töltés a limfociták koleszterin koncentrációját nemcsak a kontroll, de a II. csoport hiperkoleszterinémiás sejtjeihez képest is magasabb értékre emeli (215 $\mu$ M M $\beta$ CD/CHOL:  $1,53 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ ,  $n=3$ , mindkét esetben  $p < 0,001$ ).

#### **IV.2. A Kv1.3 ioncsatorna expressziójának vizsgálata hiperkoleszterinémia esetén**

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a limfociták koleszterinnel történő töltése lecsökkenti, a koleszterin membránból való kivonása növeli a Kv1.3 expresszióját. Ezek alapján feltételeztük, hogy a megemelkedett koleszterintartalommal jellemezhető HC sejtek Kv1.3 expressziója alacsonyabb, mint a kontroll sejteké. A Kv1.3 ioncsatorna expresszióját közvetett módon, az áramsűrűség meghatározásával jellemeztük. Az áramsűrűséget a teljes-sejt kapacitás és a +50mV-os depolarizáló impulzus során mért csúcsáram hányadosaként definiáltuk. A teljes-sejt kapacitás arányos a sejtmembrán felületével, a csúcsáram pedig a funkcionális csatornák számával. A hányados jól közelíti az egységnyi felületre jutó csatornaszámot, a funkcionális csatornaexpressziót. Eredményeink szerint a hiperkoleszterinémia nem változtatta meg szignifikánsan a +50mV-on mérhető csúcsáramot ( $I_{\text{max, kontroll}} = 642,1 \pm 44,3 \text{ pA}$ ,  $n=51$ ,  $I_{\text{max, HC I, csoport}} = 631,9 \pm 48,2 \text{ pA}$ ,  $n=57$ ,  $p=0,74$ ;  $I_{\text{max, HC II, csoport}} = 620,2 \pm 37,4 \text{ pA}$ ,  $n=42$ ,  $p=0,74$ ). Ehhez hasonlóan a sejtek kapacitása sem változott meg ( $C_{\text{m, kontroll}} = 1,68 \pm 0,17 \text{ pF}$ ,  $n=31$ ,  $C_{\text{m, HC I, csoport}} = 1,67 \pm 0,12 \text{ pF}$ ,  $n=46$ ,  $p=0,96$ ;  $C_{\text{m, HC II, csoport}} = 1,54 \pm 0,09 \text{ pF}$ ,  $n=42$ ,  $p=0,48$ ), melyből következik, hogy az áramsűrűség esetén sem találtunk szignifikáns eltérést ( $J_{\text{Kv1.3, kontroll}} = 499,3 \pm 65,4 \text{ pA/pF}$ ,

$n=39$ ,  $J_{Kv1.3, \text{ HC I. csoport}} = 450,7 \pm 41,7 \text{ pA/pF}$ ,  $n=46$ ,  $p=0,49$ ;  $J_{Kv1.3, \text{ HC II. csoport}} = 478,1 \pm 45,6 \text{ pA/pF}$ ,  $n=42$ ,  $p = 0,78$ ). A két betegcsoport között szintén nem volt eltérés ( $p=0,708$ ).

#### **IV.3. A Kv1.3 kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása hiperkoleszterinémia esetén**

Egészséges donorokból izolált limfociták M $\beta$ CD/CHOL komplexszel történő töltése lassította a Kv1.3 ioncsatorna aktivációs és inaktivációs kinetikáját. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a hiperkoleszterinémia az *in vitro* kísérletekhez hasonlóan befolyásolja-e a Kv1.3 ioncsatornák működését. A Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kinetikájának vizsgálatához rövid, depolarizációs impulzust alkalmaztunk. A gyorsan aktiválódó Kv1.3 ioncsatornák áramgörbéit a Hodgkin-Huxley szerinti modellel illesztve meghatároztuk az aktivációs kinetikát jellemző aktivációs időállandót. Az aktivációs időállandó a HC II. csoport esetén statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott, míg az I. csoport esetén nem volt szignifikánsnak tekintett eltérés a kontrollhoz képest ( $\tau_{a, \text{ kontroll}} = 0,811 \pm 0,028 \text{ ms}$ ,  $n=51$ ,  $\tau_{a, \text{ HC I. csoport}} = 0,731 \pm 0,028 \text{ ms}$ ,  $n=47$ ,  $p=0,07$ ;  $\tau_{a, \text{ HC II. csoport}} = 0,724 \pm 0,024 \text{ ms}$ ,  $n=41$ ,  $p=0,02$ ). A két betegcsoport között nem volt szignifikáns eltérés ( $p=0,859$ ). Az aktivációs kinetikát megvizsgáltuk 0 mV-ra történő depolarizációt során is, ahol a csatorna kinetikai paramétereinek feszültség függése miatt lassabb a csatorna nyitása. Ezen a tesztfeszültségen mind a két csoport esetében szignifikáns gyorsulást találtunk a kontroll sejtekhez viszonyítva ( $\tau_{a, \text{ kontroll}} = 2,28 \pm 0,13 \text{ ms}$ ,  $n=50$ ,  $\tau_{a, \text{ HC I. csoport}} = 1,86 \pm 0,09 \text{ ms}$ ,  $n=48$ ,  $p=0,05$ ;  $\tau_{a, \text{ HC II. csoport}} = 1,79 \pm 0,08 \text{ ms}$ ,  $n=40$ ,  $p=0,002$ ). A két betegcsoport esetében itt sem volt különbség ( $p=0,651$ ). A Kv1.3-ra jellemző C-típusú inaktiváció vizsgálatához két másodperc hosszú depolarizációt alkalmaztunk. Az inaktiválódó áramgörbék leszálló szárát exponenciális függvényvel illesztve meghatároztuk az inaktivációs időállandót ( $\tau_i$ ). Az inaktivációs kinetika nem mutatott eltérést a kontroll és a hiperkoleszterinémiás betegekből izolált limfociták esetén ( $\tau_{i, \text{ kontroll}} = 243,8 \pm 8,0 \text{ ms}$ ,  $n=41$ ,  $p=0,17$ ;  $\tau_{i, \text{ HC II. csoport}} = 229,3 \pm 6,9 \text{ ms}$ ,  $n = 48$ ;  $\tau_{i, \text{ HC I. csoport}} = 234,9 \pm 8,2 \text{ ms}$ ,  $n = 35$ ,  $p = 0,43$ ). A mérsékelt és a jelentősen emelkedett koleszterinnel jellemzett beteg csoportok között szintén nem volt eltérés ( $p=0,609$ ).

#### **IV.4. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése**

A kinetikai paramétereket követően megvizsgáltuk az emelkedett koleszterinszint hatását a csatorna egyensúlyi aktivációjára. Korábbi *in vitro* kísérleteinkben az áramsűrűség és kinetikai paraméterek mellett az egyensúlyi aktiváció is megváltozott, a kontroll limfociták félaktivációs feszültsége jobbra tolódott koleszterin töltés hatására. A HC sejtek egyensúlyi

aktivációját két paraméterrel jellemeztük: a félaktivációs feszültséggel ( $V_{1/2}$ , mely megadja azt a membránpotenciál értéket, ahol a csatornák fele nyitott állapotban van) és az egyensúlyi aktiváció meredekségével ( $k$ ). Ezen paraméterek a normált konduktancia-tesztfeszültség függvény illesztéséből közvetlenül meghatározhatók (G-V görbe). A kinetikai paraméterekhez hasonlóan az egyensúlyi aktiváció egyik paramétere sem mutatott eltérést hiperkoleszterinémia esetén ( $V_{1/2, \text{kontroll}} = -24,9 \pm 0,87 \text{ mV}$ ,  $n=26$ ;  $V_{1/2, \text{HC I. csoport}} = -26,5 \pm 1,0 \text{ mV}$ ,  $n=38$ ,  $p = 0,25$ ;  $V_{1/2, \text{HC II. csoport}} = -26,1 \pm 0,9 \text{ mV}$ ,  $n=27$ ,  $p=0,43$ ;  $k_{\text{kontroll}} = 10,8 \pm 0,35$ ,  $n=26$ ,  $k_{\text{HC I. csoport}} = 10,4 \pm 0,22$ ,  $n=38$ ,  $p= 0,32$ ;  $k_{\text{HC II. csoport}} = 10,0 \pm 0,26$ ,  $n=27$ ,  $p = 0,07$ ). A két betegcsoportok között szintén nem volt eltérés ( $p=0,772$ ).

#### **IV.5. Hiperkoleszterinémiás betegekből izolált limfociták osztódásának vizsgálata CFSE hígulási esszével**

A limfociták proliferációjának vizsgálatát az Anyagok és módszerek fejezetben részletesen bemutatott CFSE esszé segítségével végeztük anti-CD3/anti-CD28 stimulációt követően. Az öt napos stimuláció után a hiperkoleszterinémiás betegek limfocitái szignifikánsan alacsonyabb osztódási indexet (OI) mutattak, mint az egészséges donorokból izolált sejtek ( $OI_{\text{kontroll}}: 71,8 \pm 10,2\%$ ,  $n=10$ ;  $OI_{\text{HC I. csoport}}: 40,9 \pm 5,1\%$ ,  $n=7$ ,  $p=0,014$ ;  $OI_{\text{HC II. csoport}}: 46,0 \pm 5,0\%$ ,  $n=11$ ,  $p=0,02$ ). A két betegcsoport átlagos osztódási indexei között nem volt szignifikáns eltérés ( $p=0,65$ ).

#### **IV.6. A SLOS sejtek szterol összetételének vizsgálata GC-MS módszerrel**

Mivel az Amplex-Red esszével nem lehet különbséget tenni a koleszterin és oxidált/redukált származékai között, ezért az SLOS betegekből származó sejtek szterol összetételének vizsgálatához GC-MS módszert alkalmaztunk (Ezen kísérleteket Dr. Péter Mária, az SZBK munkatársa végezte). A perifériás vérből származó minták térfogata rendkívül limitált ezért kísérleteinkben limfociták helyett a nagy mennyiségben izolált vörösvértestek szterol összetételét határoztuk meg. A vvt mérés további előnye, hogy fejlett intracelluláris membránrendszerek hiányában a teljes sejt szterol mérése jó megközelítést ad a membrán koleszterin összetételére. Az irodalmi adatoknak megfelelően minden egyes SLOS mintában sikerült azonosítanunk a kórjelző 7-dehidrokoleszterint, valamint izomerét a 8-dehidrokoleszterint. Kontroll mintáink esetében nem voltak detektálhatóak ezen vegyületek. Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyeléseket, mely szerint a prekursor molekulák koncentrációjának növekedése mellett a sejtek koleszterin koncentrációja szignifikánsan csökkent. Az összkoleszterin és 7DHC koncentrációk mellett meghatároztuk a minták

7DHC/CHOL arányát is mely hasonló értékeket mutatott a korábbi egyetlen átfogó tanulmányban közölt eredményekhez.

#### **IV.7. A Kv1.3 ioncsatorna expressziójának vizsgálata SLOS esetén**

SLOS esetén a sejtmembrán koleszterinszintjének csökkenésén túl az előalakok (pl. 7DHC, 8DHC) koncentrációja jelentősen megemelkedik. Nem ismeretes azonban az, hogy e vegyületek tudják-e helyettesíteni akár részben akár egészben a koleszterin élettani funkcióit. Az ioncsatornák működését számos ponton befolyásolhatja a sejtmembrán szteroljainak megváltozott aránya a (trafficking, laterális diffúzió, kapuzás). Az *in vitro* kísérletekben a koleszterin membránból történő kivonása a Kv1.3 expressziójának csökkenéséhez, a kinetikai paraméterek gyorsulásához vezetett. Nincs azonban adat arra vonatkozólag, hogy a csökkent koleszterin mellett az SLOS-ben megjelenő prekursor molekulák milyen hatással vannak a Kv ioncsatornák működésére. Munkánk során az SLOS ioncsatornákra gyakorolt hatását (a hiperkoleszterinémiához hasonlóan) a betegekből izolált limfociták Kv1.3 csatornáin keresztül tanulmányoztuk. A csatorna expresszióját ismételt indirekt módon, az áramsűrűség meghatározásával jellemeztük. Az SLOS sejtek esetén a +50 mV tesztpotenciálon mért csúcsáram, a teljes-sejt membrán kapacitás és a kettő hányadosaként definiált áramsűrűség nem tért el a kontroll sejtek esetén mért értékektől ( $I_{\max, \text{kontroll}} = 528,0 \pm 69 \text{ pA}$ ,  $n = 56$ ;  $I_{\max, \text{SLOS}} = 497,5 \pm 31 \text{ pA}$ ,  $n = 51$ , 8 patients,  $p = 0,7$ ;  $C_m, \text{kontroll}} = 2,1 \pm 0,1 \text{ pF}$ ,  $n = 56$ ;  $C_m, \text{SLOS}} = 2,0 \pm 0,2 \text{ pF}$ ;  $n = 51$ ,  $p = 0,69$ ). Az áramsűrűség változatlan értéke arra utal, hogy az egységnyi felületre jutó funkcionális csatornák száma nem változik SLOS-ben ( $J_{\text{Kv1.3, kontroll}} = 282,5 \pm 42,9 \text{ pA/pF}$ ,  $n = 56$ ;  $J_{\text{Kv1.3, SLOS}} = 309,8 \pm 39 \text{ pA/pF}$ ,  $n = 51$ ,  $p = 0,65$ ).

#### **IV.8. A Kv1.3 kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása SLOS esetén**

Az SLOS sejtek aktivációs időállandója szignifikánsan megnőtt a kontroll sejtekhez viszonyítva, az inaktivációs kinetika esetén azonban nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés ( $\tau_{a, \text{kontroll}} = 0,59 \pm 0,02 \text{ ms}$ ,  $n = 56$ ;  $\tau_a, \text{SLOS}} = 0,75 \pm 0,03 \text{ ms}$ ,  $n = 51$ ,  $p = 0,001$ ,  $\tau_{i, \text{kontroll}} = 227,8 \pm 14,2$ ,  $n = 38$ ;  $\tau_i, \text{SLOS}} = 253,7 \pm 21,4$ ,  $n = 45$ ,  $p = 0,329$ ). Az aktivációs időállandó növekedéséből a csatorna aktivációjának lassulására következtethetünk, mely negatívan befolyásolhatja a Kv1.3 élettani feladatainak ellátását.

#### **IV.9. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése**

Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését jellemző félaktivációs feszültség és meredekség az ioncsatornák működésének élettani szempontjából az egyik legfontosabb paramétere. Ennek ismeretében meg lehet határozni a nyitott és zárt csatornák arányát egy

adott membránpotenciálon. Eredményeink szerint az SLOS-sejtek egyensúlyi aktivációját jellemző Boltzmann görbe a kontrollhoz viszonyítva jobbra tolódott, azaz ugyanolyan nyitási valószínűség eléréséhez az SLOS sejteket pozitívabb értékekre kell depolarizálni, mint a kontroll sejteket ( $V_{1/2, \text{kontroll}} = -26,9 \pm 0,9 \text{ mV}$ ,  $n = 41$ ;  $V_{1/2, \text{SLOS}} = -22,0 \pm 1,9 \text{ mV}$ ,  $n = 35$ ,  $p = 0,03$ ). A félaktivációs feszültség szignifikáns növekedésével szemben az egyensúlyi aktiváció meredeksége nem változott meg ( $k_{\text{kontroll}} = 11,7 \pm 0,5 \text{ mV}$ ,  $n = 41$ ;  $k_{\text{SLOS}} = 10,6 \pm 0,5 \text{ mV}$ ,  $p = 0,14$ ).

#### **IV.10. SLOS-ból izolált limfociták aktivációjának és proliferációjának vizsgálata**

Hipotézisünk szerint a sejtmembrán megemelkedett 7DHC/CHOL aránya negatívan befolyásolja a kalcium jel kialakításában részt vevő (pl. Kv1.3) ioncsatornák működését mely a T-sejt aktiváció és proliferáció károsodásához vezethet. A T-sejt aktiváció következtében számos kalciumfüggő sejt felszíni molekula expressziója megemelkedik, ezek monitorozása indirekt információt szolgáltat a limfociták aktivációjáról. Kísérleteinkben thapsigargin stimulust követően vizsgáltuk egy korai T-sejt aktivációs marker, a CD154 (más nomenklaturában CD40 ligand) expresszióját. A CD154 expressziója normál körülmények között az aktivációt követően megemelkedő intracelluláris kalcium hatására rövid időn megemelkedik. Kísérleteinkben 3 órán keresztül stimuláltunk egészséges és SLOS mononukleáris sejteket. Az aktivációt követően PE-konjugált anti-CD3-mal és A488 konjugált anti-CD154-el jelöltük a sejteket. A T-sejteket a CD3 pozitivitás alapján azonosítottuk. Eredményeink szerint az SLOS betegekben izolált mononukleáris sejtek esetén zavart szenved a T-sejt aktiváció, a CD154 pozitív T-sejtek aránya szignifikánsan csökkent ( $\text{CD3}^+ \text{CD154}^+$  sejtek aránya SLOS-ben:  $8,6 \pm 3,2\%$ ,  $n=5$ ; kontroll esetén:  $21,1 \pm 2,8\%$ ,  $n=4$ ,  $p<0,001$ ). A limfociták aktivációját a sejtek osztódása követi. Az SLOS sejtek proliferációjának vizsgálatához a korábban ismertetett CFSE hígulási esszét alkalmaztuk. A T-sejt receptorait anti-CD3 és anti-CD28 antitestek segítségével aktiváltuk, majd öt nappal később ellenőriztük a sejtek osztódását. Az SLOS betegekben izolált sejtek osztódási indexe jelentősen csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva ( $\text{OI}_{\text{kontroll}}: 61,1 \pm 7,1\%$ ,  $n = 5$ ;  $\text{OI}_{\text{SLOS}}: 29,4 \pm 3,5\%$ ,  $n = 6$ ,  $p=0,002$ ).

#### **IV.11. SLOS modellrendszer kialakítása M $\beta$ CD/7DHC komplex segítségével**

Hipotézisünk szerint a sejtmembrán megváltozott szterol összetétele felelős a Kv1.3 ioncsatorna módosult működéséért SLOS-ben. Ennek igazolására létrehoztunk egy modellrendszert, ahol *in vitro* körülmények között növeltük a sejtek 7DHC-tartalmát,

létrehozva az SLOS-re jellemző emelkedett 7DHC/CHOL arányt. A töltéshez 7DHC/M $\beta$ CD komplexet alkalmaztunk. Az egészséges donorokból izolált mononukleáris sejteket több koncentrációban inkubáltuk 7DHC/M $\beta$ CD-vel, majd GC-MS technikával ellenőriztük a töltés hatékonyságát. Eredményeink szerint a töltés dóziszfüggő módon emelte a sejtek 7DHC koncentrációját és csökkentette a koleszterin tartalmát, kialakítva az SLOS-re jellemző szterol összetételt fehérje tartalomra normált 7DHC koncentráció 65 $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC töltést követően  $26,1 \pm 1,0$   $\mu$ g/mg, míg 195 $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC töltést követően  $66,8 \pm 11$   $\mu$ g/mg. A fehérje tartalomra normált koleszterin koncentráció:  $18,3 \pm 3,7$   $\mu$ g/mg a kontroll esetén, 65 $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC töltés követően  $16,2 \pm 0,2$   $\mu$ g/mg, míg 195 $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC töltést követően  $13,3 \pm 2$   $\mu$ g/mg. Ezen adatok alapján a 7DHC töltött sejtek alkalmasak lehetnek az SLOS sejtszintű hatásainak modellezésére.

#### IV.12. Kv1.3 ioncsatornák vizsgálata SLOS modellrendszerben

A 7DHC töltés hatását a Kv1.3 expressziójára és a csatorna kapuzására egészséges donorokból izolált limfociták esetén teszteltük. A sejteket három különböző koncentrációban töltöttük M $\beta$ CD/7DHC-val, majd patch-clamp technikával vizsgáltuk a Kv1.3 kinetikai és egyensúlyi paramétereit, valamint az áramsűrűséget. Az elektrofiziológiai méréseket a korábban részletezett protokollok felhasználásával, teljes-sejt konfigurációban végeztük. A 7DHC töltés hatására a csatorna aktivációs és inaktivációs kinetikája egyaránt lelassult, az M $\beta$ CD/7DHC koncentrációjának növelésével párhuzamosan az aktivációs, inaktivációs időállandó is dóziszfüggően növekedett (kontroll:  $\tau_a = 0,59 \pm 0,02$  ms, (n=56); 32,5  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_a = 1,76 \pm 0,18$  ms, (n=7),  $p < 0,001$ ; 65  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_a = 2,04 \pm 0,15$  ms, (n=11),  $p < 0,001$ ; 195  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_a = 2,70 \pm 0,26$  ms, (n=11)  $p < 0,001$ , kontroll:  $\tau_i = 227,8 \pm 14,2$  ms, (n = 38); 32,5  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_i = 318,57 \pm 22$  ms (n = 5,  $p = 0,064$ ), 65 $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_i = 339 \pm 57$  ms (n = 6,  $p = 0,02$ ); 195 $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_i = 362 \pm 26,4$  ms (n = 5,  $p < 0,01$ ). Az egyensúlyi aktiváció esetében a  $G_N$ -V görbe dózis függően jobbra tolódott, a félaktivációs feszültség pedig szignifikánsan megnőtt (kontroll:  $V_{1/2} = -26,9 \pm 0,9$  mV, (n = 41); 32,5  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $V_{1/2} = -19,2 \pm 1,3$  mV, (n = 6),  $p < 0,01$ ; 65  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $V_{1/2} = -13,4 \pm 2,6$  mV (n = 9),  $p < 0,001$ ; 195  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $V_{1/2} = -10,1 \pm 1,9$ , (n = 9),  $p < 0,001$ ). Az egyensúlyi aktiváció meredeksége nem változott. Ezen eltérések iránya megegyezik az SLOS-ben találtakkal, mértékük azonban sokkal markánsabb. A csatorna expresszióját a korábbiakhoz hasonlóan, az áramsűrűség meghatározásával, indirekt módon jellemeztük. A 7DHC töltés hatására a teljes-sejt kapacitás nem változott, a +50mV-os

depolarizációs során mért csúcsáram azonban a kezelés koncentrációjával fordított arányosan változott (kontroll:  $C_m = 2,12 \pm 0,12$  pF, ( $n = 51$ );  $32,5 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $C_m = 2,20 \pm 0,22$  pF, ( $n = 7$ ),  $p = 0,80$ ;  $65 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $C_m = 2,02 \pm 0,29$  pF ( $n = 11$ ),  $p = 0,81$ ;  $195 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $C_m = 2,26 \pm 0,21$  pF, ( $n = 11$ ),  $p = 0,65$ ; kontroll:  $I_{\text{max}} = 527,7 \pm 68,7$  pA, ( $n = 51$ );  $32,5 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $C_m = 296,5 \pm 52,5$  pA, ( $n = 7$ ),  $p = 0,002$ ;  $65 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $C_m = 300,0 \pm 37,4$  pA ( $n = 11$ ),  $p = 0,003$ ;  $195 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC :  $C_m = 174,8 \pm 9,1$  pA ( $n = 11$ ),  $p < 0,001$ ). A két paraméter hányadosaként definiált áramsűrűség szignifikáns, dózis függő csökkenést mutatott (kontroll:  $J_{\text{Kv1.3}} = 282,5 \pm 42,9$  pA/pF, ( $n = 51$ );  $32,5 \mu\text{M}$ :  $J_{\text{Kv1.3}} = 153,0 \pm 44,8$  pA/pF, ( $n = 7$ )  $p = 0,005$ ;  $65 \mu\text{M}$ :  $J_{\text{Kv1.3}} = 176,9 \pm 26,5$  pA/pF, ( $n = 11$ ),  $p = 0,002$ ;  $195 \mu\text{M}$ :  $J_{\text{Kv1.3}} = 81,9 \pm 8,9$  pA/pF,  $p < 0,001$ , ( $n = 11$ )).

#### **IV.13. A koleszterin és 7DHC töltés Kv1.3 ioncsatornákra gyakorolt hatásának összehasonlítása**

Korábbi eredményeink szerint az *in vitro* koleszterin töltés a 7DHC töltéshez hasonlóan lassította a Kv1.3 csatorna kinetikai paramétereit, az egyensúlyi aktivációt pedig a pozitívabb membránpotenciálok felé tolta el. Felmerül a kérdés, hogy van-e eltérés a koleszterin illetve 7DHC töltés hatása között, vagy a két molekula teljesen azonos módon, az össz-szterol koncentráció emelésén keresztül hat a csatornákra. Ennek eldöntéséhez azonos koncentrációjú koleszterin és 7DHC töltést alkalmaztunk egészséges donorokból izolált limfociták esetén, majd megvizsgáltuk a Kv1.3 biofizikai paramétereit. Az elektrofiziológiai mérések alapján a két szterol hasonlóan hat a Kv1.3 működésére azonban a Kv1.3 ioncsatorna sokkal érzékenyebb azonos koncentrációjú 7DHC töltésre, mint koleszterinre.  $32,5 \mu\text{M}$  7DHC töltés esetén már szignifikánsan növekedett az aktivációs időállandó és a félaktivációs feszültség, míg a koleszterinnel végzett töltésnek ilyen körülmények között nem volt hatása (kontroll:  $\tau_a = 0,59 \pm 0,02$  ms, ( $n = 56$ );  $32,5 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/CHOL:  $\tau_a = 0,75 \pm 0,15$ , ( $n = 5$ ),  $p = 0,40$ ;  $32,5 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_a = 1,76 \pm 0,18$  ms, ( $n = 5$ ),  $p < 0,001$ ; kontroll:  $V_{1/2} = -26,9 \pm 0,9$  mV, ( $n = 41$ );  $32,5 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/CHOL:  $V_{1/2} = -24,4 \pm 3,1$  mV, ( $n = 5$ ),  $p = 0,318$ ;  $32,5 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $V_{1/2} = -19,2 \pm 1,3$  mV, ( $n = 6$ ),  $p = 0,004$ ). Magasabb koncentrációjú koleszterin a 7DHC töltéshez hasonlóan szignifikáns eltéréseket okozott, azonban a 7DHC hatása minden esetben statisztikailag is jelentősebb volt a koleszterinhez viszonyítva ( $65 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/CHOL:  $V_{1/2} = -17,4 \pm 0,58$  mV, ( $n = 5$ ),  $p = 0,29$ ;  $65 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $V_{1/2} = -13,4 \pm 2,6$  mV, ( $n = 5$ ),  $p = 0,024$ ;  $195 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/CHOL:  $V_{1/2} = -16,2 \pm 2,72$  mV ( $n = 5$ ),  $p = 0,038$ ;  $195 \mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $V_{1/2} = -10,1 \pm 1,9$  mV, ( $n = 5$ ),  $p < 0,001$ ;  $65 \mu\text{M}$

M $\beta$ CD/CHOL:  $\tau_a = 0,99 \pm 0,09$  ms, (n=5),  $p = 0,059$ ; 65  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_a = 2,04 \pm 0,15$  ms, (n = 5),  $p < 0,001$ ; 195  $\mu$ M M $\beta$ CD/CHOL:  $\tau_a = 1,05 \pm 0,09$  ms, (n = 5),  $p = 0,02$ ; 195  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_a = 2,62 \pm 0,22$  ms (n = 5),  $p < 0,001$ ).

#### **IV.14. A Kv1.3 C-terminusának eltávolítása megszünteti a csatorna szterollokkal szembeni érzékenységet**

Az feszültségfüggő ioncsatornák felépítésében részt vevő transzmembrán szegmensek szerkezete és funkciója többnyire ismert. A csatornák szigorúan értelemben vett működéséhez (kapuzás, szelektív permeabilitás) nem esszenciális C-terminálisról azonban hiányosak az ismereteink. Feltételezésünk szerint a Kv1.3 C-terminusa, mivel tartalmaz CRAC/CARC koleszterinkötő helyeket, fontos szerepet játszhat a csatorna szterollokkal történő interakciójában is. Ennek bizonyítására a vad típusú Kv1.3 (VT-Kv1.3) mellett olyan rövidített (deléciós mutáns) Kv1.3 konstruktot ( $\Delta$ C-Kv1.3) vizsgáltunk, mely esetében hiányzott a C-terminus jelentős részét kitevő, utolsó 84 aminosav. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint ezen szakasz eltávolítása nem befolyásolta szignifikánsan a csatorna működését, azaz a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek nem változtak a vad típusú csatornához képest. Kísérleteinkben a korábbiakhoz hasonló módszerrel töltöttük a  $\Delta$ C-Kv1.3 és VT-Kv1.3 ioncsatornát stabilan expresszáló CHO sejteket koleszterinnel és 7DHC-val. A töltött sejtek Kv1.3 ioncsatornáit a korábban alkalmazott elektrofiziológiai protokollok szerint vizsgáltuk, azzal az eltéréssel, hogy teljes-sejt helyett outside-out konfigurációt alkalmaztunk. A CHO sejtekben ugyanis a teljes.sejt Kv1.3 csúcsáram +50 mV-on több nA volt, az ebből adódó soros ellenállás hibáját az outside-out konfiguráció a membrán felszín és az ezzel párhuzamos áramerősség-csökkenés miatt eliminálja. A VT-Kv1.3 csatornát expresszáló CHO sejtek koleszterinnel ill. 7DHC-vel történő töltése (420  $\mu$ M) a csatorna kapuzását jellemző kinetikai paraméterek lassulását és az egyensúlyi aktiváció feszültség függésének jobbra tolódását okozza (kontroll:  $V_{1/2, VT} = -28,87 \pm 1,52$  (n = 5); 420  $\mu$ M CHOL:  $V_{1/2, VT} = -17,45 \pm 1,90$  mV (n = 7),  $p < 0,001$ ; 420  $\mu$ M 7DHC:  $V_{1/2, VT} = -19,25 \pm 4,72$  mV (n = 5),  $p = 0,028$ ; kontroll:  $\tau_{a, VT} : 0,45 \pm 0,014$  ms (n = 5), 420  $\mu$ M M $\beta$ CD/CHOL:  $\tau_{a, VT} = 0,76 \pm 0,022$  ms (n = 7)  $p = 0,002$ ; 420  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_{a, VT} = 0,69 \pm 0,059$  ms (n = 10)  $p = 0,008$ ). A CHO sejtek koleszterinnel ill. 7DHC-vel történő töltése tehát kvalitatíven hasonló eredményt adott a Kv1.3-at endogénen kifejező limfociták kezelésekor kapotthoz. Az outside-out konfigurációban kapott eredmények ezen felül megerősítik azon korábbi feltevésünket, hogy a ciklodextrin/szterol komplexek nem az ioncsatorna citoplazmatikus regulátorain keresztül befolyásolják a Kv1.3 működését, ugyanis ez utóbbiak jelentősége outside-out

konfigurációban elenyésző, a ciklodextrin/szterol komplexek hatása viszont megmarad. A Kv1.3 csatorna C-terminálisának delécioja megszüntette a csatorna szterolérzékenységét:  $\Delta$ C-Kv1.3 csatorna esetében a 420  $\mu$ M-os CHOL és 7DHC töltés nem volt hatással a csatorna kapuzására: az aktivációs időállandó és félaktivációs feszültség esetében sem volt eltérés a kezelt és kezeletlen sejtek között (kontroll:  $V_{1/2,\Delta C} = -26,73 \pm 2,72$  mV, (n = 6); 420  $\mu$ M M $\beta$ CD/CHOL:  $V_{1/2,\Delta C} = -26,30 \pm 2,72$  mV (n = 8),  $p > 0,05$ ; 420  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC :  $V_{1/2,\Delta C} = -23,05 \pm 1,08$  mV (n = 6),  $p > 0,05$ ); kontroll:  $\tau_{a,\Delta C} = 0,59 \pm 0,043$  ms (n = 6), 420  $\mu$ M M $\beta$ CD/CHOL:  $\tau_{a,\Delta C} = 0,55 \pm 0,022$  ms (n = 7),  $p > 0,05$ ; 420  $\mu$ M M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_{a,\Delta C} = 0,65 \pm 0,036$  ms (n = 10),  $p > 0,05$ ). Ezek alapján feltételezhető, hogy a csatorna C-terminusa fontos szerepet játszik a csatorna szterolok általi szabályozásában. Az intracellulárisan elhelyezkedő C-terminus, a transzmembrán régiókkal ellentétben kevésbé lehet érzékeny a sejtmembrán fizikai paramétereiben bekövetkező változásokra. Ezek alapján feltételeztük, hogy a koleszterin nemcsak a sejtmembrán biofizikai paramétereinek befolyásolásán keresztül, de specifikus lipid-fehérje interakciókon keresztül is módosíthatja a Kv1.3 kapuzását. A C-terminus aminosav szekvenciáját elemezve két potenciális koleszterinkötő helyet találtunk. A CARC1 és CARC2 szterolok általi szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatához alaninra cseréltük a vad típusú Kv1.3 csatorna koleszterinkötő szekvenciáinak esszenciális aminosavait. A mKv1.3<sub>CARC1</sub> esetén a 474. pozícióban található lizint, a 477. pozícióban lévő tirozint és a 479. pozícióban elhelyezkedő valint, a mKv1.3<sub>CARC2</sub> esetén az 517. és 518. pozícióban a lizineket, a 520. fenilalanint és a 523. pozícióban található valint cseréltük alaninra. A  $\Delta$ C-Kv1.3 konstrukt alapján várható volt, hogy a C-terminuson létrehozott pontmutációk nem fogják jelentősen módosítani a csatorna működését, azonban első lépésként összehasonlítottuk a mutáns és a vad típusú csatornák kapuzási paramétereit. A mKv1.3<sub>CARC1</sub> és mKv1.3<sub>CARC2</sub> konstruktok ionáramai, aktivációs kinetikája és az egyensúlyi aktiváció feszültség függése a trunkált csatornához hasonlóan nem tért el a vad típusú csatornától, a mutációk nem módosították jelentősen a csatorna működését. A továbbiakban a mKv1.3-mal transzfektált CHO sejteket 420  $\mu$ M koleszterinnel és azonos koncentrációjú 7DHC-vel töltöttük, majd vizsgáltuk a mKv1.3<sub>CARC1</sub> és mKv1.3<sub>CARC2</sub> csatornák biofizikai paramétereit. A mutációk hatására mindkét csatorna koleszterinnel szembeni érzékenysége módosult. Az mKv1.3<sub>CARC1</sub> esetén a félaktivációs feszültség jobbra tolódott, azonban az aktivációs időállandó nem mutatott eltérést a kezeletlen csatornához viszonyítva a koleszterin kezelést követően (kontroll:  $V_{1/2, CARC1} : -26,37 \pm 1,6$  (n = 8), 420  $\mu$ M CHOL:  $V_{1/2, CARC1} = -17,09 \pm 2,27$  mV (n = 8),  $p = 0,005$ ; 420  $\mu$ M 7DHC:  $V_{1/2, CARC1} = -18,89 \pm 1,94$  mV (n = 3),  $p =$

0,03; kontroll:  $\tau_{a, \text{CARC1}} = 0,57 \pm 0,03$  ms (n = 14), 420  $\mu\text{M}$  M $\beta$ CD/CHOL:  $\tau_{a, \text{CARC1}} = 0,62 \pm 0,04$  ms (n = 14) p = 0,248; 420  $\mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_{a, \text{CARC1}} = 0,98 \pm 0,06$  ms (n = 3) p = 0,001). Az azonos koncentrációjú 7DHC töltés az aktivációs kinetikát szignifikánsan megnövelte, a félaktivációs feszültséget pedig jobbra tolta. A mKv1.3<sub>CARC2</sub> esetén a koleszterin töltés lassította az aktivációs kinetikát, de nem volt hatása az egyensúlyi aktivációra. A 7DHC kezelés viszont a vad típusú csatornához hasonlóan módosította az mKv1.3<sub>CARC2</sub> aktivációs kinetikáját és egyensúlyi aktivációját (kontroll:  $V_{1/2, \text{CARC2}} : -26,45 \pm 3,3$  (n = 5), 420  $\mu\text{M}$  CHOL:  $V_{1/2, \text{CARC1}} = -24,26 \pm 2,27$  mV (n = 9), p=0,59; 420  $\mu\text{M}$  7DHC:  $V_{1/2, \text{CARC2}} = -16,23 \pm 1,61$  mV (n = 5), p = 0,0024; kontroll:  $\tau_{a, \text{CARC2}} = 0,44 \pm 0,01$  ms (n = 14), 420  $\mu\text{M}$  M $\beta$ CD/CHOL:  $\tau_{a, \text{CARC2}} = 0,63 \pm 0,03$  ms (n = 14) p = 0,248; 420  $\mu\text{M}$  M $\beta$ CD/7DHC:  $\tau_{a, \text{CARC2}} = 1,59 \pm 0,31$  ms (n = 3) p = 0,001).

## V. ÖSSZEFOGLALÁS

A koleszterin a sejtmembrán egyik alapvető építőeleme, valamint számos biológiailag aktív molekula előanyaga. A vér emelkedett koleszterin tartalmával járó hiperkoleszterinémia az egyik leggyakoribb zsírsanyagcsere-zavar. Kevésbé ismertek a koleszterin bioszintézis veleszületett károsodásával járó genetikai betegségek (pl. Smith-Lemli-Opitz szindróma, SLOS), ahol a koleszterin szint csökkenése mellett a különböző előalakok felhalmozódnak a vérben és szövetekben. A T-sejtek koleszterintartalmának *in vitro* módosítása megváltoztatja a sejtek aktivációjához nélkülözhetetlen Kv1.3 ioncsatorna működését, azonban nincs olyan átfogó tanulmány, mely igazolná ennek kórélettani jelentőségét. Kísérleteinkben hiperkoleszterinémiás, illetve Smith-Lemli-Opitz szindrómában szenvedő betegekből izoláltunk limfocitákat, és vizsgáltuk a megváltozott membránkoleszterin összetételének hatását a Kv1.3 ioncsatornák és a T-sejtek működésére. A szterolok Kv1.3 ioncsatornákra gyakorolt hatásának részletesebb megértéséért megvizsgáltuk a Kv1.3 C-terminusán található, feltételezett koleszterinkötő helyek szerepét a sejtmembrán *in vitro* módosított membrán koleszterin összetétele mellett. A kísérletek alapján elmondható, hogy a hiperkoleszterinémia nem befolyásolta jelentősen a Kv1.3 működését, szemben a korábbi *in vitro* eredményekkel. Ennek oka az lehet, hogy a hiperkoleszterinémiás sejtek koleszterin tartalma nem éri el a koleszterinnel töltött sejtekét. Ezt támasztja alá egy kiugróan magas koleszterinnel rendelkező személy T-sejtjeinek vizsgálata, ugyanis esetében az *in vitro* töltéshez hasonló eredményeket kaptunk. Ezek alapján úgy tűnik, hogy hiperkoleszterinémia esetében csak kiugróan magas szérumkoleszterin-értékeknél kell számítani a Kv1.3 ioncsatorna működésének

megváltozására. A limfociták osztódási képessége a Kv1.3 ioncsatorna állapotától függetlenül csökkent.

Smith-Lemli-Opitz szindrómában lassult a csatorna kinetikája (aktiváció, inaktiváció) és az egyensúlyi aktiváció jobbra tolódott. Hasonló eltéréseket találtunk az egészséges sejtek 7DHC töltését követően. Az ioncsatornák által szabályozott T-sejt funkciók közül az aktiváció és a proliferáció is zavart szenvedett. A C-terminuson található feltételezett koleszterin kötőhelyek mutációja csökkentette a csatorna szterollokkal szembeni érzékenységet. Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a sejtmembrán szterol-összetételének *in vivo* megváltozása az ioncsatornák működésének befolyásolásán keresztül kórélettani következményekkel járhat, hozzájárulva például az SLOS-ben talált neurológiai és kardiovaszkuláris tünetek kialakulásához.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program kiemelt projekt (Eötvös Lóránd Hallgatói Pályázat Balajthy András részére, pályázati azonosító: A2-ELMH-12-0010) és a Stratégiai K+F műhelyek kiválósága GINOP-2.3.2- 15-2016-00015 pályázat keretében zajlott.

## VI. PUBLIKÁCIÓK



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/212/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Balajthy András  
Neptun kód: GCAX07  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balajthy, A.**, Somodi, S., Pethő, Z., Péter, M., Varga, Z., Szabó, G., Paragh, G., Vigh, L., Panyi, G., Hajdu, P.: 7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome.  
*Pflugers Arch.* 468 (8), 1403-1418, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-016-1851-4>  
IF: 3.654 (2015)
2. Somodi, S., **Balajthy, A.**, Szilágyi, O., Pethő, Z., Harangi, M., Paragh, G., Panyi, G., Hajdu, P.: Analysis of the K<sup>+</sup> current in human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in hypercholesterolemic state.  
*Cell. Immunol.* 281 (1), 20-26, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.004>  
IF: 1.874



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443  
E-mail: [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) □ Honlap: [www.lib.unideb.hu](http://www.lib.unideb.hu)



---

További közlemények

3. Olamendi-Portugal, T., Bartók, Á., Zamudio, F. Z., **Balajthy, A.**, Becerril, B., Panyi, G., Possani, L. D.: Isolation, chemical and functional characterization of several new K<sup>+</sup>-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*.  
*Toxicon*. 115, 1-12, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.02.017>  
IF: 2.309 (2015)
4. Pethő, Z., **Balajthy, A.**, Bartók, Á., Bene, K., Somodi, S., Szilágyi, O., Rajnavölgyi, É., Panyi, G., Varga, Z.: The anti-proliferative effect of cation channel blockers in T lymphocytes depends on the strength of mitogenic stimulation.  
*Immunol. Lett.* 171, 60-69, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.02.003>  
IF: 2.483 (2015)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,32

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
5,528

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

Debrecen, 2016.08.15.

