

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Feszültségkapuzott káliumcsatornák kapuzásának vizsgálata
modern biofizikai módszerekkel**

dr. Zákány Florina

Témavezető: Prof. Dr. Panyi György



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2020**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	7
1.1 Általános bevezetés	7
1.2 A feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_V) felépítése: a feszültség szenzor domén és a pórusdomén szerkezete, valamint a két domén közti csatolási mechanizmusok bemutatása	11
1.3 A K_V csatornák kapui: az aktivációs kapu, valamint az N- és C-típusú inaktivációs kapuk bemutatása.....	14
1.4 Az általunk vizsgált K_V csatornák kapuzása: az aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuzás, valamint a két kapu közötti kommunikáció bemutatása	17
1.5 A koleszterin szerkezete és membránbeli eloszlása	19
1.5.1. A koleszterin szerkezete.....	19
1.5.2 A koleszterin vertikális megoszlása a sejtmembránban	20
1.5.3 A koleszterin laterális megoszlása a membránban, a lipidtutaj-elmélet.....	21
1.6 A koleszterin és a K_V ioncsatornák közötti kölcsönhatások bemutatása.....	22
1.6.1 A koleszterin és fehérjék közötti direkt kölcsönhatások: koleszterinkötő motívumok, régiók és domének.....	23
1.6.2 A koleszterin és fehérjék közötti indirekt kölcsönhatások	25
1.6.3 A koleszterin és membránfehérjék közötti direkt és indirekt kölcsönhatások elkülönítése .	27
1.7 A koleszterin K_V ioncsatornákra kifejtett hatásai és azok mechanizmusa	29
1.8 A $K_V1.3$ és $K_V10.1$ ioncsatornák fiziológias folyamatokban és betegségekben betöltött szerepeinek összefoglalása.....	31
2. Célkitűzések	35
3. Anyagok és módszerek.....	40
3.1 Molekuláris biológia	40
3.2 Expressziós rendszerek, transzfekció és mRNS injektálás.....	40
3.3 A sejtmembrán szterol tartalmának módosítása	41
3.4 Elektrofiziológia.....	42
3.4.1 Kételektrodás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF).....	42
3.4.2 Patch-clamp mérések outside-out konfigurációban.....	43
3.4.3 Patch-clamp mérések inside-out konfigurációban.....	43
3.5 Konfokális lézer pásztázó és stimulált emisszió depléció (STED) mikroszkópia.....	44
3.6 Adatok elemzése	45
3.6.1 Kételektrodás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) mérések elemzése	45
3.6.2 Outside-out konfigurációban történő patch-clamp mérések elemzése	48
3.6.3 Inside-out konfigurációban történő patch-clamp mérések elemzése.....	48
3.6.4 Konfokális lézer pásztázó és (STED) mikroszkópiás mérések elemzése.....	50
3.7 Statisztika	51
4. Eredmények.....	52

4.1 Szterolok hatása a $K_V1.3$ ioncsatorna feszültségfüggő kapuzásának egyensúlyi és kinetikai paramétereire.....	52
4.2 Szterolok hatása a $K_V10.1$ feszültségfüggő kapuzásának egyensúlyi és kinetikai paramétereire.....	57
4.3 Szterolok hatása a VSD és az ionáram aktivációs kinetikájára.....	60
4.4 A szterolok által okozott áramcsökkenés mechanizmusának vizsgálata.....	64
4.5 A $K_V1.3$ és $K_V10.1$ lipidtutajokkal való asszociációjának vizsgálata	66
4.6 A kísérleti stratégia bemutatása a <i>Shaker-IR T449A/V474C</i> ioncsatornában negatív membránpotenciálokon végbemenő, inaktivációhoz vezető útvonalak tanulmányozásához.....	69
4.7 Az aktivációs kapu nyitása megfigyelhető a <i>Shaker-IR T449A/V474C</i> ioncsatornában negatív membránpotenciálok mellett.....	73
4.8 A nyitott állapotban rögzített aktivációs kapu megakadályozza a <i>Shaker-IR T449A/V476C</i> csatornák C-típusú inaktivációból történő visszatérését	78
5. Diszkusszió	85
5.1 A szterolok nem a VSD-n keresztül fejtik ki hatásukat K_V ioncsatornában.....	85
5.2 A membránstressz szerepe a szterol hatások mediálásában.....	88
5.3 Lipidtutajbéli lokalizáció változása szterol töltések hatására.....	88
5.4 A szterol töltések által okozott áramcsökkenés oka.....	89
5.5 A szterolok által okozott változások specificitása, a koleszterin és a 7DHC által kifejtett hatások összehasonlítása	90
5.6 A $K_V1.3$ és $K_V10.1$ ioncsatornák szterolok általi modulációjának jelentősége különböző betegségekben	92
5.7 A koleszterin K_V ioncsatornákra gyakorolt hatásmechanizmusának általunk javasolt modellje	93
5.8 Az aktivációs kapu szerepe az egyensúlyi inaktiváció és az inaktivációból való visszatérés folyamatainak szabályozásában negatív membránpotenciálok esetén	94
5.9 A zárt állapotból bekövetkező inaktiváció különböző ioncsatornák esetén.....	95
5.10. A <i>T449A/V474C Shaker-IR</i> csatorna esetén kapott kísérletes eredmények kritikus elemzése, a C→CI átmenet lehetőségének vizsgálata negatív membránpotenciálok esetén.....	98
5.11 A <i>T449A/V476C Shaker-IR</i> csatorna esetén kapott kísérletes eredmények kritikus elemzése, az OI→O átmenet lehetőségének vizsgálata negatív membránpotenciálok esetén	100
5.12 Általános összefoglalás	101
6. Összefoglalás.....	105
7. Summary	106
8. Irodalomjegyzék.....	107
9. Tárgyszavak	119
10. Köszönetnyilvánítás	120
11. Függelék.....	121

Rövidítések jegyzéke

7DHC: 7-dehidrokoleszterin

ABC: „ATP-binding cassette” ATP-t kötő kazetta

ABCB1: „ATP-binding cassette sub-family B member 1” ATP-t kötő kazettát tartalmazó fehérjecsald B alcsaldjának 1. tagja

ABCG1: „ATP-binding cassette sub-family G member 1” ATP-t kötő kazettát tartalmazó fehérjecsald G alcsaldjának 1. tagja

ABCG1: „ATP-binding cassette sub-family G member 2” ATP-t kötő kazettát tartalmazó fehérjecsald G alcsaldjának 2. tagja

ADWX-1: a BmKTx *Buthus martensii* Karsch skorpióból származó toxin szintetikus peptidanalógja

Ala: alanin

APETx4: *Anthopleura elegantissima* tengerirózsából származó toxin

BK: „big potassium = large conductance calcium-activated potassium channel” feszültség és kalcium által aktivált nagy konduktanciájú káliumcsatorna

C: „closed state” zárt állapot

CARC: „reverse or mirror version of the CRAC” koleszterinkötő motívum

CCM: „Cholesterol Consensus Motif” koleszterinkötő motívum

C_D: „deep closed state” mély zárt állapot

Cd²⁺: kadmium ion

CI: „closed-inactivated state” zárt-inaktivált állapot

CRAC: „Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus” koleszterinkötő motívum

C-típusú inaktiváció: lassú inaktiváció

CTX-B: koleratoxin B alegység

Cys: cisztein

DP: dipólpotenciál

eag: K_v csatornák ether-à-go-go családja

EC: extracelluláris

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

EGFP: „enhanced green fluorescent protein” javított fluoreszcenciájú zöld fluoreszcens protein

EGTA: etilénlikol-tetraecetsav

ER: endoplazmás retikulum

E_{ekv}: a kálium egyensúlyi potenciálja

FLAG: DYKDDDDK epitóp

F_{norm} -V: normált fluoreszcencia intenzitás-feszültség görbe

F-V: fluoreszcencia intenzitás-feszültség görbe

GABA_A: „gamma-aminobutyric acid” gamma-aminovajsav receptor A típusa

GFP-GPI: „green fluorescent protein- glycosylphosphatidylinositol” zöld fluoreszcens protein-glükozilfoszfatidilinozitol

G_{norm} : normált konduktancia

G_{norm} -V: normált konduktancia-feszültség görbe

GPCR: „G protein-coupled receptor” G-proteinhez kapcsolt receptor

GPI: „glycosylphosphatidylinositol” glükozilfoszfatidilinozitol

G-V: konduktancia-feszültség görbe

HC: hiperkoleszterinémia

HCN: „hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel” hiperpolarizáció által aktivált és ciklikus nukleotid által szabályozott csatorna

HEK 293: „human embryonic kidney” humán embrionális vesesejt vonal

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav

HERG: humán Ether-à-go-go-Related Gene

HSD: „honestly significant difference” statisztikai teszt

HsTx1: *Heterometrus spinifer* skorpióból származó toxin

IC: intracelluláris

IF: „inactivated fraction” inaktiválódó áramhányad

ILT mutáns: az S4 régióban V369I, I372L és S376T mutációkat hordozó *Shaker* csatorna

ipi: „interpulse interval” pulzusok közötti intervallum

I_x : a P_x által kiváltott áram

k: meredekségi együttható

K^+ : káliumion

KCHIP: „K⁺ channel-interacting protein” káliumcsatornával kölcsönható fehérje

KCNE: „K⁺ voltage-gated channel subfamily E” feszültségfüggő káliumcsatorna járulékos alegység „E” alcsalád

KcsA: „K channel of *Streptomyces A*” *Streptomyces A* káliumcsatornája

Kir: „inward rectifier potassium channel” befelé egyenirányító káliumcsatorna

krio-EM: krio-elektronmikroszkópia

K_v : feszültségfüggő káliumcsatorna

M β CD: metil-béta-ciklodextrin

MD szimuláció: molekuláris dinamikai szimuláció

MTS-TAMRA: metántioszulfonát-5(6)-karboxitetrametilrodamin

nAChR: „nicotinic acetylcholine receptor” nikotinerg acetilkolin receptor

Nav: feszültségfüggő nátriumcsatorna

NBD-koleszterin: 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)metil]amino]-27-norkoleszterin

N-típusú inaktiváció: gyors inaktiváció

O: „open state” nyitott állapot

OI: „open-inactivated state” nyitott-inaktivált állapot

PAP-1: 5-(4-Fenoxibutoxi)psoralen

PAS: Per-Arnt-Sim domén

PD: „pore domain” pórusdomén

Po: „open probability” csatornák nyitási valószínűsége

PUFA: „polyunsaturated fatty acid” többszörösen telítetlen zsírsav

P_x: a hárompulzusos protokoll x-edik pulzusa

RCF: „recovered current fraction” visszatért áramhányad

Shaker-IR: „Shaker inactivation-removed” N-típusú inaktivációval nem rendelkező Shaker ioncsatorna

ShK: *Stichodactyla helianthus* skorpióból származó toxin

SLO szindróma: Smith-Lemli-Opitz szindróma

SSI: „steady-state inactivation” egyensúlyi inaktiváció

STED: stimulált emisszió depléció mikroszkópia

τ_{act} : áramok aktivációs időállandója

TEA⁺: tetraetil-ammónium

TEVCF: „two-electrode voltage-clamp fluorometry” kételektrodás voltage-clamp fluorimetria

τ_{inact} : áramok inaktivációs időállandója

TMRM: tetrametilrodamin maleimid

τ_{rec} : inaktivációból való visszatérés időállandója

TRP: tranziens receptorpotenciálú csatorna

TRPM8: tranziens receptorpotenciálú csatorna, melasztatin alcsoport 8. tagja

TRPV1, TRPV4: tranziens receptorpotenciálú csatorna, vanilloid alcsoport 1. és 4. tagja

TTVGYGD: K_v csatornák szelektivitási filterében található speciális szekvencia

V_{1/2}: félaktivációs feszültség

VSD: „voltage sensor domain” feszültség szenzor domén

WT: „wild-type” vad típusú

1. Bevezetés

1.1 Általános bevezetés

Az ioncsatornák speciális transzmembrán fehérjék, amelyekben közös, hogy a sejtmembránon keresztül egy hidrofil pórust képezve biztosítják az ionok extracelluláris és intracelluláris terek közötti áramlását. Az ioncsatornákat az általuk vezetett ionok, működésük és felépítésük alapján oszthatjuk különböző családokra, amelyek szerteágazó funkciókkal vesznek részt számos biológiai folyamatban. Érdeklődésünk középpontjában a feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_v) állnak, amelyek mind ingerelhető, mind pedig klasszikusan nem ingerelhető sejtekben kulcsfontosságú szerepet töltenek be számos sejtfunkció mediálásában. A K_v ioncsatornák négy alegységből állnak, az egyes alegységek pedig hat transzmembrán helikális szegmentumból (S1-S6) épülnek fel. Az alegységeken belül a hélixeket intra- és extracelluláris aminosavhurkok, míg az egyes alegységeket nem-kovalens kölcsönhatások tartják össze. Az S1-S4 hélixek építik fel a csatorna feszültség-szenzor doménjét (VSD), míg az S5-S6-os hélixek formálják a pórusdomént (PD). A két domén közötti strukturális kapcsolatot egyes csatornáknál az S4-S5 linker, míg másoknál a transzmembrán hélixek közötti intramolekuláris kölcsönhatások biztosítják. A membránpotenciál érzékeléséért a VSD, a káliumionok (K^+) áramlásának koordinálásáért a PD-ben található aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuk és a szelektivitási szűrő felelősek. Az aktivációs kapu a pórus intracelluláris, míg a C-típusú inaktivációs kapu a pórus extracelluláris bejáratánál helyezkedik el. A csatorna kapuzása a feszültség-szenzor, az aktivációs és inaktivációs kapuk összehangolt működése során valósul meg. Depolarizáció hatására a zárt állapotban levő (C) csatorna aktivációs kapuja kinyit, így funkcionálisan vezető állapotba (O) kerül, majd ha a depolarizáció továbbra is fennáll, az inaktivációs kapu bezáródik, kialakítva a már nem vezető inaktivált állapotot. A kapuzási sémában szerkezeti állapotként ezt OI kapuzási állapotnak nevezzük, ami arra utal, hogy az aktivációs kapu még nyitva van, míg az inaktivációs kapu zárt. A depolarizáció megszűnésével az aktivációs kapu bezáródik, az inaktivált csatorna kapuzási sémában feltüntetett szerkezeti állapota pedig a CI, ami arra utal, hogy mind az aktivációs kapu, mind pedig az inaktivációs kapu zárt állapotban vannak. Amennyiben megfelelő ideig kellően negatív membránpotenciálon tartjuk a csatornákat, akkor az inaktivációs kapu kinyílik, így az inaktivációból való visszatérés folyamata révén a csatorna visszakerül a kiindulási zárt állapotba (C).

Az ioncsatornák kapuzása igen összetett folyamat, több ponton befolyásolható különböző ioncsatornán kívüli, illetve azon belüli (intrinsic) kölcsönhatások által. Az ioncsatornán kívüli tényezők közül kiemelendő a sejtmembránban található koleszterin, ami az egyik fő meghatározója a membrán biofizikai tulajdonságainak, vertikális és laterális heterogenitásának, amely tényezők együttesen jelentősen hozzájárulnak a különböző funkcionális membrándomének kialakulásához. Mivel a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák és a koleszterin közötti interakciók, vagy azok változásai számos fiziológias és patológias folyamatban jelentős tényezőként szerepelnek, a koleszterin és az ioncsatornák közötti kölcsönhatások vizsgálatával számos tanulmány foglalkozott. Az utóbbi években elterjedt új technikák (például a krio-elektronmikroszkópia (krio-EM), vagy a szuperrezolúciós mikroszkópia), valamint a molekuláris dinamikai (MD) szimuláció terén bekövetkező jelentős fejlődés egy teljesen új perspektívát nyitott a protein-koleszterin interakciók vizsgálatában, ami a téma iránt újra felkeltette az érdeklődést. A korábbi tanulmányok két típusú interakciót különböztettek meg a koleszterin és különböző transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák között: egy direkt, ligandszerű kölcsönhatást, ahol a koleszterin különböző kötőhelyekhez kötődve módosítja az ioncsatornák működését, illetve indirekt kölcsönhatást, ahol a koleszterin a membrán biofizikai tulajdonságainak (membránfluiditás, -rigiditás, -vastagság, laterális nyomás, lipid rendezettség, dipólpotenciál) módosításán keresztül fejt ki hatását. A koleszterin és az ioncsatornák közötti kölcsönhatások mediálásában szerepet játszhatnak a koleszterin lipidtutajokon keresztül kifejtett hatásai is. A lipidtutajokban ugyanis eltérő a membránszerkezet és a fehérjekörnyezet, ami az indirekt hatásokat módosíthatja; illetve a tutajokban a megnövekedett koleszterintartalom a direkt kölcsönhatások fellépésének valószínűségét befolyásolhatja. Ezeket egyes tanulmányok a koleszterin-fehérje kölcsönhatások harmadik mechanizmusaként jellemezzék. Az ioncsatornák, azon belül is a feszültségkapuzott káliumcsatornák megfelelő modellfehérjék a transzmembrán fehérje-koleszterin kölcsönhatások vizsgálatához, ugyanis a kapuzás során mind a feszültség szenzor, mind pedig a pórust alkotó hélixek mozgása és konformációváltása a környező lipidmembránban, így azzal kölcsönhatásban valósul meg, a membrán koleszterin pedig közvetlenül is képes a foszfolipid kettősréteg tulajdonságait módosítani. Az ioncsatornák esetén a koleszterin hatásainak funkcionális feltérképezése relatíve egyszerű, mivel az ionáramok mérésével számos olyan paraméter meghatározható (például egyensúlyi aktiváció és inaktiváció, nyitási valószínűség, egyedi csatorna konduktancia, áram aktivációs és inaktivációs kinetikák), amelyek jól leírják a koleszterin által okozott módosítások funkcionális következményeit. A témában megjelent korai tanulmányok a közvetlen elektrofiziológiai

hatások leírására szorítkoztak, majd a lehetséges hatásmechanizmusok vizsgálata során először az indirekt, membránbiofizikai és lipidtutajokon keresztüli hatásmódokat valószínűsítették. A képkötő és különböző számítógépes modellezési technikák elterjedésével ez az irányvonal átalakult, és előtérbe került a direkt kölcsönhatások fontosságának hangsúlyozása. Függetlenül a direkt vagy indirekt hatásmechanizmustól nem ismert az, hogy az ioncsatorna működésében kialakuló funkcionális változások melyik doménon (VSD, PD vagy a két domén közti csatolási apparátuson) keresztül következnek be.

Az ioncsatornák kapuzását befolyásoló belső, az ioncsatorna fehérjén belüli intrinsic kölcsönhatások közül a figyelem középpontjába került az ioncsatornák egyes kapui közötti kommunikáció. Ezek közül is annak megismerése volt kiemelő, hogy a C-típusú inaktivációs kapuzást meghatározza az aktivációs kapu helyzete. Az aktivációs és a C-típusú inaktivációs kapuk kétirányban csatoltak: az aktivációs kapu nyitása elősegíti az inaktivációs kapu záródását és gátolja annak nyitását, tehát elősegíti a C-típusú inaktiváció kialakulását. Ugyanakkor a C-típusú inaktivációs kapu zárt állapota felgyorsítja az aktivációs kapu nyitását és lassítja annak záródását. A csatolásra és az egyes kapuzási átmenetek valószínűségére vonatkozó ismereteink főleg pozitív membránpotenciálok alkalmazása mellett kapott adatokból származtak, mivel ilyen membránpotenciálok mellett van jelen akkora hajtóerő és nyitási valószínűség, amelyek viszonylag könnyen mérhető ionáramokat biztosítanak. A kapuzási átmenetek pontos mechanizmusa negatív membránpotenciál mellett, ahol az ionáram hiányában szerkezet-funkció alapú megközelítéssel kell adatot gyűjteni, nem ismert.

A disszertáció középpontjában a fentiekből következően két kérdéskör állt. Egyrészt vizsgáltuk, hogy a feszültségkapuzott káliumcsatornák esetén melyik funkcionális domén érintett elsődlegesen a koleszterin által létrehozott elektrofiziológiai hatások közvetítésében a pórus felé. A koleszterin elsősorban a feszültség-szenzor domén működését befolyásolja, amely másodlagosan tevődik át a csatolási apparátuson keresztül a pórusra? Vagy ezzel ellentétben a pórus érintett elsődlegesen és így a feszültség-szenzor működését nem befolyásolja a koleszterin? A kísérletekkel új oldalról vizsgálhatjuk a koleszterin-K_v ioncsatornák közötti interakciókat és közelebb kerülhetünk a koleszterin hatásmechanizmusának megértéséhez, ami számos, a membrán koleszterintartalmának megváltozásával járó betegség molekuláris alapjainak a megértését segítheti elő. A másik kérdéskör az volt, hogy a kapuzás során hogyan befolyásolja az aktivációs kapu aktuális állapota a C-típusú inaktivációs kapu mozgását, annak záródását, illetve nyitását, negatív membránpotenciálok mellett. Létrejöhet-e az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból (C→CI átmenet), az aktivációs kapu kinyílása nélkül? Szükséges-e az aktivációs kapu bezáródása negatív membránpotenciálon ahhoz, hogy a csatorna az

inaktivált állapotából visszatérjen a zárt állapotba? Mindkét esetben az inaktivációs kapu mozgása az aktivációs kapu rögzített (zárt, illetve nyitott) állapota mellett valósulna meg, a két kapu közötti szoros allosztérikus csatolás ellenére. A negatív membránpotenciálok melletti kapuzási átmenetek tanulmányozásának az ad élettani jelentőséget, hogy a CI állapot betöltöttsége, azaz a CI állapot kialakulása és az inaktivációból történő visszatérés jelentősen meghatározza a potenciálisan aktiválható csatornák számát, ami a sejtek ingerelhetőségének egyik meghatározó tényezője.

Mindkét kérdéskör vizsgálatára olyan újszerű és érzékeny módszereket alkalmaztunk, amelyek révén olyan, eddig nem ismert eredményekre tehetünk szert, ami új megvilágításba helyezi az ioncsatornák kapuzásának finomhangolásával kapcsolatos jelenlegi tudásunkat. Azt, hogy a K_v ioncsatornák esetében melyik funkcionális domént (VSD, PD, vagy a két domén közti csatolási apparátus) befolyásolja elsődlegesen a membránban levő koleszterin, kételektródás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) technikával vizsgáltuk. Ez a technika lehetővé teszi, hogy a feszültség-szenzor extracelluláris részére pontmutációval bevitt ciszteint szelektíven megjelöljük egy cisztein specifikus fluoreszcens festékkel, így a kapuzás során a VSD mozgása végig nyomonkövethetővé válik, míg a pórus aktuális állapotáról az egyidejű ionárammérések segítségével kapunk információt. Ahogy az a későbbiek során látható, mind az ionáramok, mind pedig a fluoreszcenciás jelek nagysága, valamint azok minősége (jó jel-háttér és jel-zaj arányok), lehetővé tették számunkra, hogy érzékeny és pontos betekintést nyerjünk a koleszterin ioncsatornán belüli elsődleges, eddig ismeretlen támadáspontját illetően. A C-típusú inaktivációval kapcsolatos kísérletek során az általunk alkalmazott, a kísérletek céljaihoz tervezetten alakított, többszörösen mutáns *Shaker* ioncsatornák lehetővé tették a zárt állapotból bekövetkező C-típusú inaktiváció ($C \rightarrow CI$), valamint a nyitott aktivációs kapu melletti inaktivációból történő visszatérés ($OI \rightarrow O$) lehetőségének szelektív tanulmányozását. A $C \rightarrow CI$ átmenet meglétét olyan kísérletes körülmények között vizsgáltuk, ahol az aktivációs kapu nyitását a negatív membránpotenciálokon tapasztalható kis hajtóerő és az alacsony nyitási valószínűség ellenére is érzékenyen tudtuk nyomonkövetni az általunk alkalmazott gyorsperfúziós rendszer, illetve állapotfüggő cisztein specifikus módosítási esszé segítségével. Az $OI \rightarrow O$ átmenet vizsgálatánál az aktivációs kapu nyitott állapotban történő rögzítésének alapja egy Cd^{2+} -híd kialakulása volt a mutációval bevitt cisztein, illetve egy natív hisztidin aminosav között. Mindkét kísérletsorozatban az általunk beépített cisztein és a gyorsperfúzióval alkalmazott Cd^{2+} között létrejövő kémiai kölcsönhatás biztosította a kísérletek specifikusságát. A Cd^{2+} -ot tartalmazó oldatok gyorsperfúziós rendszerrel történő precíz alkalmazása

biztosította, hogy a Cd^{2+} -ot szelektíven, csak a csatorna általunk kiválasztott kapuzási állapotaiban alkalmaztuk.

1.2 A feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_V) felépítése: a feszültségszenzor domén és a pórusdomén szerkezete, valamint a két domén közti csatolási mechanizmusok bemutatása

A K_V csatornák négy alegységből felépülő tetramerek, amelyek együttesen alakítják ki a csatorna két fő funkcionális doménjét, a feszültségszenzor domént (VSD), illetve a pórusdomént (PD) ¹ (**1A**). Az egyes alegységek hat transzmembrán helikális szegmenst tartalmaznak (S1-S6), amelyek közül az első négy (S1-S4) a VSD felépítésében, míg az S5-S6 szegmensek az azokat összekötő linkerekkel együtt a centrális pórus domén kialakításában vesznek részt ^{2,3} (**1B**). A feszültségkapuzott káliumcsatornák elnevezésére használt K_V rövidítés a csatornák kálium iránti szelektivitására, illetve az elsődleges kapuzási ingerükre (feszültség-voltage) utal, ezt követően a számok 1-12 között pedig a funkcionális- és szekvenciahomológia alapján felállított fő családokat jelölik. A K_V csatornákon ($\text{K}_{V1.x}$ – $\text{K}_{V12.x}$) belül az ioncsatornák alegységeinek általános szerkezeti és funkcionális fenotípusa erősen konzervált, így sokszor a különböző alegységek heterotetramereket alkotnak egymással, amely révén különböző szövetekben számos eltérő sejtfunkció szabályozásában tudnak részt venni. A $\text{K}_{V1.x}$ – $\text{K}_{V4.x}$, $\text{K}_{V7.x}$, $\text{K}_{V10.x}$ – $\text{K}_{V12.x}$ alegységek homo- és heterotetramereket (pl. $\text{K}_{V1.3}$ és $\text{K}_{V1.5}$ alegységből álló heterotetramerek) hoznak létre, míg a $\text{K}_{V5.x}$, $\text{K}_{V6.x}$, $\text{K}_{V8.x}$ és $\text{K}_{V9.x}$ számára nélkülözhetetlen partner a $\text{K}_{V2.x}$ ⁴. A különböző szövetekben a K_V csatornák funkciójának finomhangolásában az alegységösszetétel mellett fontos tényezők a csatornákkal kölcsönható járulékos fehérjék, mint a $\text{K}_V\beta$, KCHIP („ K^+ channel–interacting protein” káliumcsatornával kölcsönható fehérje), KCNE („ K^+ voltage-gated channel subfamily E” feszültségfüggő káliumcsatorna járulékos alegység „E” alcsalád) vagy a kalmodulin, amelyek a csatornákhöz általában azok N- vagy C-terminális citoszolikus elhelyezkedő doménjein keresztül kötődnek ⁵.

Az általam részletesen tanulmányozott egyik ioncsatorna a *Shaker* csatorna, amely a *Drosophila melanogaster* feszültségkapuzott káliumcsatornája. A csatorna fontos szerepet játszik a kifejlett rovar és az azt megelőző fejlődési alakok harántcsíkolt izom, illetve idegszövetének működésében, ugyanis a csatornán átfolyó káliumáram részt vesz többek között a lárvák neuromuszkuláris junkciójában a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulás terminálásában ⁶. A *Shaker* elnevezés az éter anesztéziában jelentkező lábremegésből adódik,

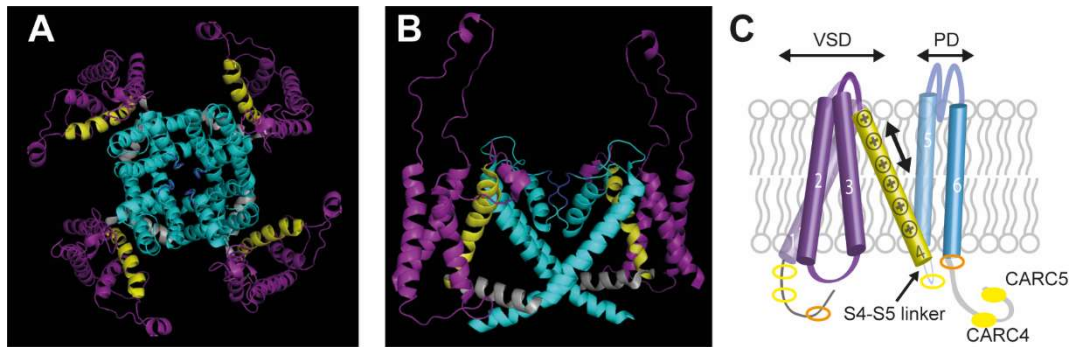
amely a csatornát kódoló génben leírt mutáció eredményeképpen jelentkezik. Ugyan a *Shaker* az emberi szervezetben nem fordul elő, mégis kiemelt szerepet kap számos humán ioncsatorna szerkezet-funkciójának tanulmányozásában. Ennek oka, hogy a csatorna nagymértékű szekvencia homológiát, ezáltal mind strukturális, mind pedig funkcionális hasonlóságot mutat az emberi szervezetben előforduló, szintén feszültségkapuzott káliumcsatornák egyik csoportjával, a *Shaker*-típusú káliumcsatornákkal ($K_v1.x$), így ezen csatornák kapuzásának, szerkezet-funkciójának megismerésére vonatkozó korábbi kutatások nagy része a *Shaker* csatornát használta fel modellként.

A csatorna pórusdoménjét az S5-S6-os szegmentumok és az ezeket összekötő hurok hozza létre. Ez több fontos strukturális elemet tartalmaz. Az S5-S6-os szegmentumokat összekötő hurokszekvenciában található többek között az egyéb kationokkal (pl. Na^+) szembeni K^+ szelektivitást biztosító, a különböző eredetű káliumcsatornában igen konzervatívan megőrzött GYGD szekvencia (úgynevezett „signature” szekvencia, **1. ábra A és B** panel sötétkék), ami a csatorna szelektivitási szűrőjének felépítéséért felelős ⁷. A bakteriális K^+ csatorna (KcsA „K channel of *Streptomyces A*” *Streptomyces A* káliumcsatornája) és a magasabb rendű élőlények feszültségkapuzott káliumcsatornák kristályszerkezetének tanulsága szerint a csatornák pórusai négy szekvenciális kálium kötőhelyet tartalmaznak. Ezen felül egy szintén extracelluláris elhelyezkedésű rehidrációs-dehidrációs kötőhelyet is feltételeznek ⁸. A modern szerkezetbiológiai vizsgálómódszerekkel nyert eredmények tehát megerősítették az elektrofiziológiai módszerrel korábban leírt kötőhelyek létezését, ahol is Ba^{2+} ionok póruson keresztüli áramlásának mérésével négy K^+ kötőhelyet feltételeztek a pórusban ^{9,10}. Az S5-S6-os szegmentumokat összekötő hurokszekvencia további érdekessége, hogy a csatorna ezen régióján található „torony régió” felelős számos fentebb említett peptid típusú gátlószer (pl. skorpiótoxin) kötődéséért is. A toxin-csatorna kölcsönhatás elemzése, mint molekuláris mérőszalag, indirekt módon számos információt nyújtott a pórusrégió és a szelektivitási filter struktúrájáról ^{11,12}. Az így nyert következtetéseket röntgenkrisztallográfiás kísérletekkel igazolták a *Shaker* családba sorolható $K_v1.2$ csatorna esetén ³. A pórusdomén tartalmazza még a csatorna aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuit, melyek felépítését, és funkcióit lentebb tárgyalom.

A membrán depolarizációját a VSD érzékeli a benne található pozitív töltésű aminosav oldalláncok révén. Depolarizáció során az S4 szegmensek a membrán síkjából kifelé, az extracelluláris tér felé mozdulnak el, míg hiperpolarizációkor befelé, a citoszolikus tér felé, így a VSD konformációváltozásainak meghatározásában kulcsfontosságú szerepet kap a membránpotenciál aktuális értéke ^{13,14} (**1C ábra**). A pórusdoménben a csatorna nyitáshoz

követlenül vezető konformációváltozás, ami jórészt feszültségtől független, az S6 szegmensek intracelluláris végén történik és az itt található aktivációs kapu nyitását eredményezi. Azt a folyamatot, amely során a VSD-k mozgása a pórusra tevődik át a csatorna feszültségfüggő nyitását eredményezve, csatolásnak nevezzük. Általánosságban a K_v csatornák esetén ez a VSD és PD között levő S4-S5 linker (**1A, 1B ábra** szürke) által létrehozott rigid kapcsolódáson alapul, ami a VSD aktivációját követően emelőként működve nyitja ki a PD-n található aktivációs kaput. Ezzel szemben néhány K_v csatorna esetén a domének közötti csatolás a VSD és PD egymással szomszédos hélixeknek lazább, nehezebben definiálható kölcsönhatásain alapul¹⁵⁻¹⁷. K_v1.3 és *Shaker* ioncsatornák esetén az előbbi mechanizmus figyelhető meg, amely szoros „lineáris” csatolást biztosít a VSD és a PD között, míg az *ether-à-go-go* (*eag*) család tagjainál, így K_v10.1-nél a két funkcionális domén közötti csatolás a lazább mechanizmus szerint valósul meg^{17,18}. Ezt jól bizonyítja, hogy míg a K_v10.1 feszültségfüggő kapuzása intakt marad az S4-S5-linker által kialakított „emelő” enzimikus átvágása vagy mutációval történő delécioja esetén is, addig a lineáris modell szerint kapuzó K_v csatornák esetén ezek a módosítások az aktivációs kapuzás megszűnését eredményezik¹⁹.

A K_v10.1 csatornák másik karakterisztikus tulajdonsága a Cole-Moore shift jelensége, amely során az áram aktivációs kinetikája módosul a depolarizáció előtti tartófeszültség függvényében. A jelenség következményeként, amikor a csatornát negatívabb tartófeszültségekről depolarizáljuk, az áram aktivációs kinetikája lassabb és az áramgörbe kezdeti szigmoid fázisa kifejezettebb, mivel a csatornák aktivációja ilyenkor mélyebb zárt állapotokból (C_D) indul. Így például -160 mV-os tartófeszültség mellett a C_D→C_D→C_D→C→O átmenetek miatt kifejezetten lassú és szigmoid az aktivációs kinetika, míg a -60 mV-os tartófeszültség mellett mért áramok esetében az aktivációs kinetika gyorsul, és az áramgörbe kezdeti szakasza kevésbé szigmoid, mivel a C_D állapotok közötti átmenetek jó része már lezajlik ezen a tartófeszültségen.



1. ábra A feszültségkapuzott káliumcsatornák általános felépítése

(A) A feszültségfüggő káliumcsatornák (K_V) négy alegységből épülnek fel. A K^+ átjutását lehetővé tevő pórus kialakításáért a pórusdomén (PD, kék), míg az aktuális membránpotenciál érzékeléséért a feszültség-szenzor domén (VSD, lila, illetve az S4 hélix, sárga) a felelős. (B) Minden alegység hat transzmembrán hélixből épül fel, amelyek intra- vagy extracelluláris hurkokon keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Az A panel felülnézetből ábrázolja a $K_{V1.2}$ ioncsatorna mind a négy alegységét, a B panel pedig a $K_{V1.2}$ ioncsatorna két, egymással szemben fekvő alegységének felépítését mutatja oldalnézetből, a csatorna zárt állapotában²⁰. Mind az A, mind pedig a B paneleken levő ábrát a PyMol program segítségével szerkesztettem a 3LUT jelű PDB fájl felhasználva, amely a $K_{V1.2}$ kiméra ioncsatorna röntgenkristallográfiás vizsgálatokból származó szerkezeti adatait tartalmazza. A $K_{V1.2}$ felépítését tekintve jól reprezentálja a disszertációban bemutatott káliumcsatornák szerkezeti sajátosságait. Az S1-S4 hélixek (lila és sárga) a VSD kialakításában, míg az S5 és S6 hélixek (világoskék) a PD felépítésében vesznek részt. A PD-ben az S5-S6-os hélixeket összekötő hurokban sötétkék színnel a szelektivitási szűrőt (GYGD szekvencia) jelöltük. Az S4 hélixben (sárga) pozitív töltéssel rendelkező aminosav oldalláncok találhatóak (hat darab a $K_{V1.3}$ ioncsatorna esetén), amelyek a membránpotenciál-változás érzékelésének kulcsfontosságú szereplői. A $K_{V1.3}$ -ban a VSD és a PD közötti csatolásért felelős linkert a benne található helikális struktúrával együtt szürkével tüntettem fel. (C) A membrán depolarizációjának hatására az S4 hélix felfelé mozdul el (nyíl mentén) és ez a mozgás tevődik át a csatorna csatolási apparátusán, a $K_{V1.3}$ ioncsatorna esetén az intracellulárisan található S4-S5 linker (szürke, nyíllal jelölt) keresztül a pórusdoménre, lehetővé téve a káliumionok átjutását a membránon. Az egyes hélixeket a rajtuk feltüntetett számok jelzik. A K_V ioncsatornák mind az N-terminális, mind pedig a C-terminális intracelluláris végükön számos speciális domént tartalmazhatnak, amelyek a csatornák működésének finomhangolásában vesznek részt. A K_V ioncsatorna esetén számos koleszterinkötő motívumot (CRAC: narancssárga oválisok; CARC: sárga oválisok) írtak le (lásd később az 1.6.1-es fejezetben). A C-terminárisan, intracellulárisan elhelyezkedő CARC4 és CARC5 motívumok (kitöltött sárga oválisok) jelentősége funkcionális szempontból kísérletesen is bizonyított.

1.3 A K_V csatornák kapui: az aktivációs kapu, valamint az N- és C-típusú inaktivációs kapuk bemutatása

A K_V csatornák alapvetően háromféle kapuval rendelkezhetnek, működésük során meghatározó az aktivációs és a különböző inaktivációs (N-, illetve C-típusú) kapuk összehangolt működése. Az aktivációs kapu a PD S6-os hélixének intracelluláris végénél helyezkedik el, felépítésében a 475-478-as pozíciójú aminosavak által alkotott peptidszakaszok vesznek részt, amelyek a csatorna zárt állapotában keresztezik egymást²¹⁻²⁴. A depolarizáló impulzus hatására az aktivációs kapu nyitásával az ioncsatorna képessé válik a K^+ ionok szelektív vezetésére. A fenntartott depolarizáció hatására a csatorna egy funkcionálisan nem vezető, úgynevezett inaktivált állapotba kerül. Az inaktiváció alapvetően két mechanizmus révén mehet végbe a K_V ioncsatornáknál.

Bizonyos K_V csatornában az inaktiváció N-típusú inaktiváció révén megy végbe, amely során az N-terminálisan elhelyezkedő inaktivációs labda a pórusba bekötődve lezárja a permeációs útvonalat ²⁵. Az N-típusú inaktivációért felelős inaktivációs labdákat a *Shaker* csatorna esetén a csatorna alegységeinek N-terminális részén levő, 6-46-os pozícióban található aminosavak építik fel ²⁶. Bizonyítottan mindig csak az egyik inaktivációs labda vesz részt az inaktivált állapot kialakításában, mintegy belülről eltömítve a csatorna pórusát ²⁷. Az egyes inaktivációs labdák között negatív kooperáció figyelhető meg ²⁸. A folyamatban az inaktivációs labdák szerepét az teszi egyértelművé, hogy ezen peptid szakaszok enzimatiszta eltávolításával az N-típusú inaktiváció folyamata meggátolható, illetve ezt követően a rendszerhez kívülről visszaadva az inaktivációs labdákat, az újból kialakítható ²⁹. További jellegzetesség, hogy intracellulárisan alkalmazott pórusblokkolókkal (pl. TEA^+ (tetraetil-ammónium) az N-típusú inaktiváció folyamata lassítható, illetve meggátolható, ami az inaktivációs labda és az adott pórusblokkoló szomszédos, részben átfedő pórusbeli kötőhelyeivel magyarázható ³⁰. Az inaktivációs labdán kívül egyes káliumcsatornához kapcsolódó β alegységeken található inaktivációs domének is képesek N-típusú inaktivációt létrehozni, a fentebb részletezett mechanizmushoz hasonlóan ³¹.

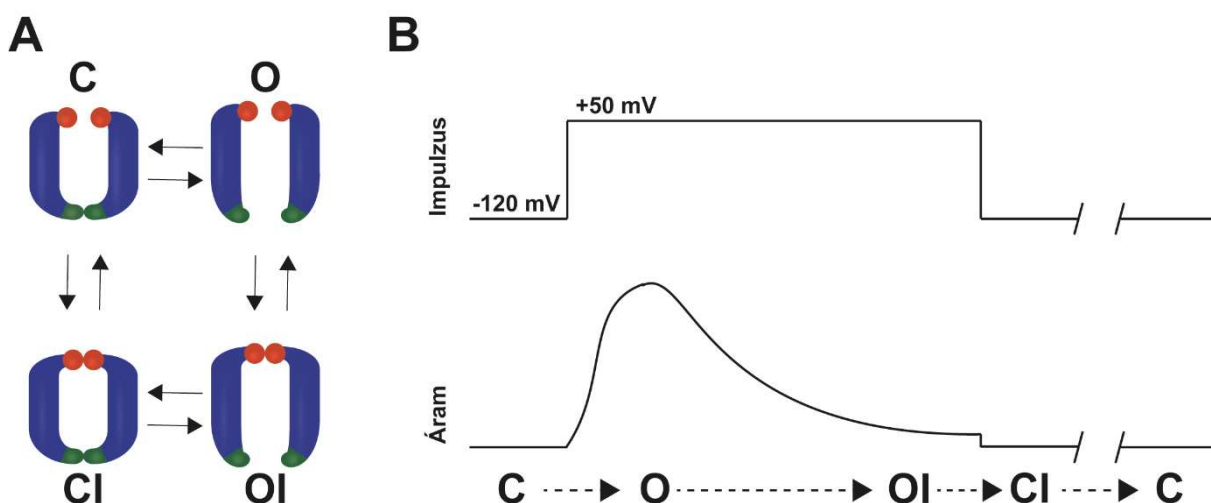
A másik, ettől eltérő mechanizmus a C-típusú inaktiváció, ami szerkezetileg a szelektivitási szűrő konformációváltozásaihoz kötődik, és a pórusdomén extracelluláris térhez közeli, az alegység C-terminusához közelebb eső, C-típusú inaktivációs kapu záródása révén jön létre ^{25,32-36}. Az N-típusú inaktiváció folyamatával szemben a C-típusú inaktiváció pontos molekuláris mechanizmusa, annak kiemelt biológiai jelentősége ellenére, a mai napig sem tisztázott. A kapu alkotásában részt vesz a szelektivitási szűrő, annak kölcsönhatásai a pórust alkotó hélixekkel, és újabb tanulmányok a szelektivitási szűrő mögötti üregben elhelyezkedő „inaktivációs” vízmolekuláknak is jelentős szerepet tulajdonítanak az inaktiváció ^{37,38} és az inaktivációból való visszatérés ³⁹ folyamataihoz kapcsolódó molekuláris átrendeződések szabályozásában. A mechanizmust tekintve bizonyítást nyert, hogy a C-típusú inaktivációt a csatornát alkotó négy alegység kooperatív módon hozza létre ⁴⁰, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy a C-típusú inaktiváció kinetikáját tekintve lényegesen lassabb folyamat, mint a fentebb bemutatott N-típusú inaktiváció. A C-típusú inaktiváció sebessége számos tényezővel mutat összefüggést. Ezek közül kiemelendő a *Shaker* csatorna 449-es pozíciójában található aminosav minősége. Ha az ebben a pozícióban a vad típusú csatornában megtalálható treonint alaninra cserélik, az inaktiváció jelentősen gyorsul, míg a hisztidinnel, vagy más aromás aminosavval történő csere az inaktiváció lassulását eredményezi ⁴¹. Továbbá ismert tény az is, hogy az N-típusú inaktiváció ⁴² és bizonyos intracelluláris pórusblokkolók ⁴³ gyorsítják a C-típusú

inaktiváció sebességét, míg az extracelluláris K^+ koncentráció növelésével az inaktiváció lassulása figyelhető meg⁴⁴. Ezek a megfigyelések azzal magyarázhatók, hogy a csatorna pórusában a szekvenciálisan elhelyezkedő K^+ kötőhelyek közül a legkülső kötőhely telítettsége gátolja a C-típusú inaktivációhoz vezető molekuláris átrendeződéseket, egy hasonlattal élve úgy, mint egy láb az ajtó becsukódását („foot-in-the-door” mechanizmus)⁴³. Érdekes az extracelluláris pH és a C-típusú inaktiváció sebességének kapcsolata, ugyanis míg a *Shaker* csatornában⁴⁵ és a legtöbb *Shaker* családba sorolható $K_v1.x$ csatorna esetén az extracelluláris pH csökkenésekor az inaktiváció gyorsulása figyelhető meg, addig a szintén a *Shaker* családba sorolható $K_v1.3$ esetén a C-típusú inaktiváció kinetikája lassul. Ennek kulcsfontosságú szerepe lehet a limfociták gyulladási szövetekben történő aktivációjának szabályozásában⁴⁶. A *Shaker* családba sorolható ioncsatornák egy része mindkét inaktivációs mechanizmus révén inaktiválódhat, míg kiemelendő, hogy a limfociták domináns káliumcsatornája, a $K_v1.3$ ioncsatorna kizárólag C-típusú inaktivációt mutat, ugyanis nem rendelkezik N-terminális inaktivációs labdákkal.

Míg az N-típusú inaktiváció milliszekundumos időskálán alakul ki, addig a C-típusú inaktiváció folyamata ettől eltér, és sokkal lassabb, több 10 ms-tól több s-ig terjedő időskálán jön létre. Ennek megfelelően a kiváltott áramok fenotípusa alapján a K_v csatornákat két fő csoportba sorolhatjuk: az N-típusú inaktiváció révén gyorsan inaktiválódó A-típusú áramot vezető csatornák; illetve a lassan vagy egyáltalán nem inaktiválódó késői egyenirányító (delayed rectifier) csatornák. Az első csoportba tartozók főleg a neuronok és izomsejtek ingerelhetőségét szabályozzák⁴⁷⁻⁴⁹. A második típusba sorolt C-típusú inaktivációval inaktiválódó csatornák fontos szerepet játszanak különféle biológiai folyamatok szabályozásában, így a neuronok akciós potenciáljának modulációjában⁵⁰, szívizomsejtekben az akciós potenciálok időtartamának és frekvenciájának regulációjában^{51,52}, illetve nem ingerelhető immunsejtek⁵³⁻⁵⁵ és endokrin sejtek⁵⁶ aktivációjának szabályozásában. A *Drosophila melanogaster Shaker* káliumcsatornája hasonló felépítésű és kapuzású, mint a humán K_v csatornák. Az N-típusú inaktivációs labdától mentes *Shaker-IR* („*Shaker* inactivation-removed” N-típusú inaktivációval nem rendelkező *Shaker* ioncsatorna csatorna) ezáltal az egyik leginkább elfogadott modellcsatorna a K_v ioncsatornák C-típusú inaktivációjának szelektív tanulmányozásához^{25,26,57}.

1.4 Az általunk vizsgált K_V csatornák kapuzása: az aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuzás, valamint a két kapu közötti kommunikáció bemutatása

Az N-típusú inaktivációtól mentes *Shaker*-IR csatornában (valamint a szintén N-típusú inaktivációtól mentes $K_V1.3$ ioncsatornában) az ionok áramlását a pórus intracelluláris oldalán, a négy S6 hélix egymással való kereszteződése révén kialakított aktivációs kapu²¹⁻²⁴, valamint a pórus extracelluláris bejáratánál, a szelektivitási szűrő régiójában található C-típusú inaktivációs kapu egymással összehangolt nyitása és zárása szabályozza. Ennek megfelelően négy fő kapuzási (szerkezeti) állapotot különíthetünk el a csatorna kapuzási ciklusa során: a zárt (C), nyitott (O), nyitott-inaktiválódott (OI) és a zárt-inaktiválódott (CI) állapotokat, amelyeket részleteiben a **2. ábra** mutatja be^{24,38,39,58}. A négy kapuzási állapot meglétét korábban számos funkcionális (pl. elektrofiziológia), és szerkezeti információt szolgáltató módszert (pl. röntgenkristallográfia, krio-elektronmikroszkópia), valamint molekuláris dinamikai modellezést alkalmazó tanulmány bizonyította^{15,32,34,35,59,60}.



2. ábra A négyállapotos kapuzási modell, illetve a kapuzási folyamatot kísérő káliumáram bemutatása

(A) A *Shaker*-IR csatornák kapuzása egy négyállapotos kapuzási modell segítségével írható le, amelyben a négy fő kapuzási állapotot az aktivációs (sötétzöld gömbök) és inaktivációs (piros gömbök) kapuk aktuális állapota alapján különíthetjük el egymástól. Az ioncsatornákat ábrázoló piktogramok mindegyike két egymással szemben elhelyezkedő pórusdomént ábrázol. A zárt (C), nyitott (O), nyitott-inaktivált (OI) és zárt-inaktivált (CI) állapotok közül egyedül a nyitott állapot képes K^+ ionok vezetésére. Az ábrán fekete nyilakkal jelöltük a kapuzási állapotok között elméletileg lehetséges átmeneteket. A B panel egy tipikus, -120 mV-ről $+50$ mV-ra történő depolarizáció során kapott káliumáram sémáját mutatja be az idő függvényében. Jól látható rajta, hogy a depolarizáció kezdetén amíg a csatorna zárt állapotban van (C) áram nem folyik, ami csak az aktivációs kapu nyitása (O) révén jelenik meg, ami előbb elér egy maximális amplitúdót, majd az ionáram a fenntartott depolarizáció hatására végbemenő C-típusú inaktiváció megjelenésével folyamatosan csökkenni kezd és végül elér egy egyensúlyi értéket ('steady-state áram', OI). Végül a depolarizáció végeztével az aktivációs kapu bezárul (CI), az ionáram eltűnik, és a csatornák az inaktivációból való visszatérés révén újra a kiindulási zárt állapotba (C) kerülnek. Az áramgörbe alatti feliratok az ioncsatorna aktuális kapuzási állapotait mutatják.

Az aktivációs kapu nyitását és zárását a membránpotenciál szabályozza. Az aktivációs kapu a membrán depolarizációjának hatására kinyílik, míg a repolarizáció hatására bezáródik^{21,24}. A depolarizáció hatására kinyíló aktivációs kapu lehetővé teszi a csatornán keresztül az ionok áramlását, azaz alapesetben a sejtekből kifelé irányuló káliumáram megjelenését (**2B ábra**). Az aktivációs kapu nyitását követően a hosszantartó depolarizáció az inaktivációs kapu záródása révén a C-típusú inaktiváció kialakulásához vezet (O→OI), ami mivel egy nem vezető állapot, az ionáram csökkenésével jár együtt. Az ionáram nagysága az egyensúly beálltát követően nem nulla, hanem egy olyan egyensúlyi (steady-state) áramot tudunk mérni ilyenkor, amelynek nagyságát az adott membránpotenciál értéken a vezető és nem vezető állapotban lévő csatornák aránya határozza meg. Olyan depolarizáció mellett, ahol minden csatorna kinyit (a nyitási valószínűség (P_o) ~ 1) az egyensúlyi áram szempontjából a nyitott, illetve inaktivált csatornák aránya lesz meghatározó. Ezt követően, az impulzusprotokoll szerint, a negatív membránpotenciál az aktivációs kapu záródását okozza (OI→CI). A CI állapotú csatornák inaktivációból való visszatéréséhez megfelelő ideig kellően negatív membránpotenciál jelenléte szükséges (CI→C)^{25,58}. A C-típusú inaktivációból való visszatérés folyamatáról és pontos molekuláris mechanizmusáról a többi kapuzási átmenethez képest szintén keveset tudunk. Az inaktivációból való visszatérés mértékét több tényező is befolyásolja, többek között az extra- és intracelluláris kationok koncentrációja, az extracelluláris pH és a membránpotenciál nagysága⁶¹⁻⁶⁵. Az inaktivációból történő visszatérés több szekundumos folyamata során a sebesség meghatározó lépés a CI→C átmenet, mivel az OI→CI igen gyorsan végbemegy (ms-os nagyságrendű) a *Shaker* csatornában⁵⁸. Az aktivációs és inaktivációs kapuk csatoltak egymással. Ismert, hogy az aktivációs kapu nyitása elősegíti az inaktivációs kapu záródását, tehát elősegíti a C-típusú inaktiváció kialakulását, a zárt inaktivációs kapu pedig gyorsítja az aktivációs kapu nyitását és lassítja annak záródását.^{32,58-60,66} A csatolás a kapuk közötti allosztérikus kommunikációs útvonalak révén valósul meg⁶⁷. Ezek alapján feltételezhető, hogy az aktivációs kapu állapota jelentősen befolyásolja az inaktivációból történő visszatérést lehetővé tevő szerkezeti változásokat. A disszertáció egy része ennek a kérdésnek a megválaszolására irányul, azt vizsgáltuk, hogy az aktivációs kapu záródása feltétele-e az inaktivációból történő visszatérésnek.

A két kapu közötti csatolás vizsgálatára, valamint az egyes kapuzási átmenetek valószínűségének meghatározására irányuló kísérletek pozitív membránpotenciálok alkalmazása mellett történtek, mivel a pozitív membránpotenciálok mellett van jelen akkora hajtóerő, és olyan magas csatornanyitási valószínűség, amely jól mérhető, viszonylag nagy amplitúdójú ionáramok kialakulását biztosítja, ezáltal azok egyszerű patch-clamp mérésekkel

is vizsgálhatók. Ezzel szemben negatív membránpotenciálok mellett mind a hajtóerő, mind pedig a nyitási valószínűség kicsi, így a kialakuló ionáram is alacsony amplitúdóval bír, emiatt az ionáramok mérése jelentős hibát hordoz magában. Ezáltal a negatív membránpotenciálok mellett bekövetkező kapuzási átmenetekről lényegesen kevesebb információval rendelkezünk. A csatorna nyitását eredményező átmenet ($C \rightarrow O$) valószínűsége csak az egyik meghatározója a depolarizáció során megjelenő ionáramnak. Hasonlóan fontos tényező annak megismerése, hogy a csatornák mekkora hányada van nyitásra alkalmas, zárt állapotban (C). Utóbbi elsősorban a negatív membránpotenciálok esetén végbemenő átmenetek határozzák meg, azaz az egyensúlyi állapotban a CI és C állapotban található csatornák egymáshoz viszonyított aránya, amit az egyensúlyi inaktiváció jelensége jól tükröz. Mi határozza meg a CI és C egyensúlyt? A káliumcsatornák kapuzási sémája alapján elképzelhető, hogy létezik direkt $C \rightarrow CI$ átmenet, míg a kapuk csatolásának ismeretében valószínűbb, hogy negatív membránpotenciál mellett, ahol az egyensúlyi inaktiváció kialakul, a csatorna aktivációs kapuja kinyílik, és a CI állapot az $OI \rightarrow CI$ útvonalon töltődik be. Ezek a kérdések továbbra is részben megválaszolatlanok, annak ellenére, hogy a mind az egyensúlyi inaktiváció, mind pedig az inaktivációból történő visszatérés döntően meghatározza a potenciálisan aktiválható csatornák számát, ami a sejtek ingerelhetőségének egyik meghatározó tényezője. A fentiek alapján az aktivációs kapu kontrollálhatja mind az egyensúlyi inaktivációt, mind pedig az inaktivációból történő visszatérést, ezáltal az $OI \rightarrow CI \rightarrow C$ átmenetek részletesebb vizsgálata hozzájárulna a kapuzási folyamatok részletes megismeréséhez és ezen keresztül hatékonyabb, a csatornákhöz állapotfüggő módon kötődő gyógyszerek tervezéséhez, amelyek csatornákhöz való kötődésének valószínűségét a csatorna aktivációs és/vagy inaktivációs kapuinak nyitott állapota határozza meg.

1.5 A koleszterin szerkezete és membránbeli eloszlása

1.5.1. A koleszterin szerkezete

A koleszterin a gerincesek sejtmembránjának fontos szerkezeti alkotóeleme. A sejtmembránban sokféle különböző funkciót ellátó fehérje található, így ioncsatornák, ATP-függő ionpumpák, ABC („ATP-binding cassette” ATP-t kötő kazetta) transzporterek, G-fehérjéhez kapcsolt receptorok és receptor tirozin kinázok, amelyek mindegyikének működését szabályozhatja a koleszterin. A koleszterin széleskörű biológiai hatásai annak köszönhetőek, hogy a molekula egyedi amfipatikus kémiai szerkezete révén számos kölcsönhatást alakíthat ki

mind lipidekkel, mind fehérjékkel. Egyrészt a kisméretű, poláris részét létrehozó hidroxil csoportja hidrogénkötést alakíthat ki a membránlipidek és –fehérjék poláris csoportjaival, másrészt pedig nagyméretű apoláris rigid tetraciklikus gyűrűrendszerének planáris α felszíne kötődhet fehérjékhez C-H- π kölcsönhatásokon keresztül. A molekula β felszínén található alifás csoportok pedig a fehérjék elágazó aminosavaihoz kapcsolódhatnak van der Waals kölcsönhatások segítségével ^{68,69}. A 7-dehidrokoleszterin (7DHC) a koleszterin prekursora, amely attól csupán annyiban különbözik, hogy egy extra kettős kötést tartalmaz a szterol gyűrű 7-es pozíciójában, illetve a vegyület felhalmozódik a 7-dehidrokolin-reduktáz enzim veleszületett defektusa által okozott Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómában (részletesen lásd az 1.8-as fejezetben) ⁷⁰.

1.5.2 A koleszterin vertikális megoszlása a sejtmembránban

A koleszterin a sejtmembrán külső és belső rétegében egyaránt megtalálható, pontos vertikális megoszlásával kapcsolatban azonban számos ellentmondás merül fel az irodalomban ⁷¹. Bár gyors flip-flop mozgása alapján várható lenne a molekula homogén vertikális megoszlása ⁷², lipidekkel vagy fehérjékkel való preferenciális kölcsönhatásai aszimmetrikus megoszlásának kialakulását eredményezhetik. Mivel a sejtmembránban preferált kölcsönható partnere a csaknem kizárólag a membrán külső rétegében található szfingomielin, kezdetben azt valószínűsítették, hogy főleg exofaciálisan fordul elő ⁷³. Ezzel szemben a későbbi kutatások többségének eredményei azt mutatták, hogy a koleszterin koncentrációja magasabb a sejtplazma felé néző rétegben ⁷⁴. A koleszterin belső rétegben való lokalizációját magyarázhatja az a megfigyelés, hogy modellmembránokban erős affinitást mutat a nagy görbülettel rendelkező membránrégiók iránt. Ennek hátterében az állhat, hogy a koleszterin lecsökkenti az ilyen területeken szintén feldúsuló foszfatidil-etanolamin jelenléte által okozott kedvezőtlen szabadenergia-változás mértékét ⁷⁵. Az előbbiekkal éles ellentétben egy nemrég megjelent tanulmány 12-szer magasabb koleszterin mennyiséget mutatott ki a membrán exofaciális rétegében a citoszolikus felszínhez képest, amely eltérés hátterében az ABC-transzporterek aktivitását valószínűsítették ⁷⁶, bár újabb eredmények megkérdőjelezték az adatok megbízhatóságát ⁷⁷. A koleszterin vertikális megoszlásában bekövetkező változásokkal kapcsolatban felvetették, hogy azok befolyásolhatják különböző sejtfunkciók működését ⁷⁶.

1.5.3 A koleszterin laterális megoszlása a membránban, a lipidtutaj-elmélet

A koleszterin membránkomponensekkel kialakított kölcsönhatásai miatt laterális megoszlása nem homogén a sejtmembránban. A transzmembrán fehérjéket egy alacsonyabb mobilitással rendelkező lipidekből álló burok veszi körül, amelyet gyakran lipid annulusnak neveznek. Az annulushoz képest való elhelyezkedés szerint a koleszterin lokalizációja lehet nonannuláris (a fehérjék szerkezetén belül az egyéb lipidektől elfedve), annuláris (a fehérje felszínével szomszédos lipidburokban), illetve az annuluson kívül (a membránban található fehérjét körülvevő lipidburokokon kívül) ⁷⁸. Egyedi kémiai szerkezete miatt a koleszterin preferenciálisan kötődik szfingolipidekhez és glikoszfingolipidekhez. A glicerolipidekhez képest a (gliko)szfingolipidek telítettebbek és több hidrogénkötés kialakítására képesek, mivel amid és hidroxil csoportjuk révén ezen kötésekben akceptorként és donorként egyaránt viselkedhetnek. Ennek eredményeképpen a (gliko)szfingolipidek hajlamosak asszociálni egymással, bár feji csoportjaik nagy mérete limitálja pakolódási denzitásukat ⁶⁹. Az „esernyő modell” alapján ez a helyzet kedvező a koleszterinnel való kölcsönhatásuk számára: a koleszterin a szfingolipidek közé ékelődhet oly módon, hogy nagyméretű apoláris részét elfedik a szfingolipidek nagyméretű feji csoportjai, kivédve így a koleszterin vízzel történő energetikailag rendkívül kedvezőtlen érintkezését ⁷⁹. A koleszterin és (gliko)szfingolipidek közötti kölcsönhatásokat erősítheti sztöchiometrikus „kondenzált komplexek” képződése, amely további nagyméretű molekula klaszterek kialakulását facilitálhatja ⁸⁰. A lipidek közötti ilyen jellegű preferenciális kölcsönhatások képezték a kezdeti lipidtutaj-hipotézis alapját, amely szerint a lipidtutajok 10-200 nm méretű termodinamikusan instabil klaszterek, amelyekben nagy mennyiségben találhatóak koleszterin molekulák, telített foszfolipidek és (gliko)szfingolipidek és jellemző rájuk a lipidek magas fokú rendezettsége és pakolási sűrűsége ⁸¹. A lipidtutaj-elméletet megalkotása óta számos vita övezte ⁸², különösen a transzmembrán fehérjék és az aktin citoszkeleton elemeinek aktív szerepét illetően, amely végül a tutajok kiterjesztett definíciójának megalkotásához vezetett. A jelenleg leginkább elfogadott nézet szerint a tutajok létrejöttének alapját a szfingolipid és koleszterin molekulák asszociációs potenciálja képezi, amelyet azonban jelentősen, precízen és aktív módon befolyásol a transzmembrán fehérjék jelenléte, illetve az aktin citoszkeleton hálózat, továbbá ezek specifikus kémiai kölcsönhatásai. A lipidtutaj-mikrodomének asszociálódhatnak egymással funkcionálisan aktív nagyméretű platformokat képezve ⁸³⁻⁸⁵.

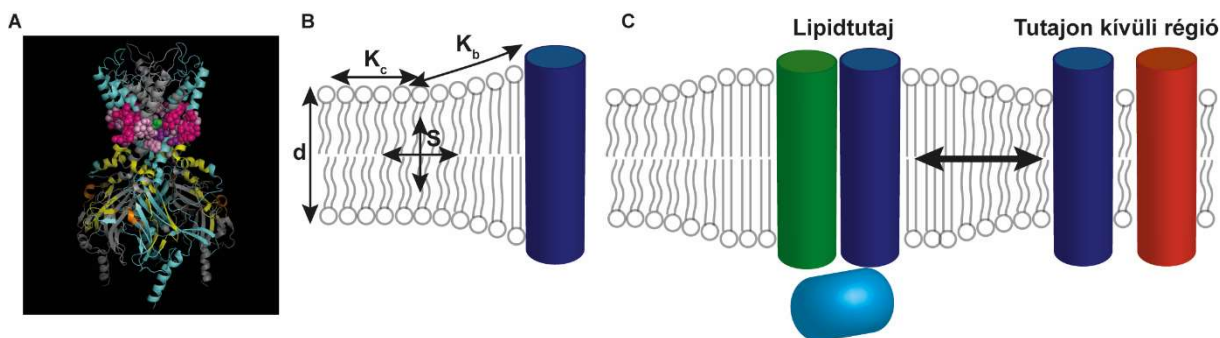
A membránban található molekulák dinamikus módon bejuthatnak ezekbe a mikrodoménekbe, illetve kijuthatnak onnan, bár bizonyos fehérjék különösen nagy affinitást

mutatnak a lipídutajok iránt, amelynek háttérében ezen proteinek glükózil-foszfátidilinozitol (GPI)-horgonya, palmitoilációja és/vagy mirisztoilációja, szterol konjugációja, transzmembrán doménjének speciális tulajdonsága vagy koleszterinkötő motívuma állhat ⁸⁶. A utajok koncentráció platformot képezhetnek a kölcsönható molekulák számára, míg mások kizorolhatnak onnan, amely révén ezen mikrodomének hatékonyan modulálhatnak különböző jelátviteli útvonalakat, ezen keresztül pedig szerepet játszhatnak az apoptózis, a sejtosztódás, -adhézió és -migráció, a szinaptikus transzmisszió, a citoskeletális szerveződés, a fehérje sorting folyamataiban, valamint a patogének sejtbe jutása, az amiloid plakkok képződése és az extracelluláris vezikulák formációja során. A fehérjék utaj és nem-utaj membránrégiók közötti megoszlásának megváltozása patogenetikai jelentőséggel bírhat tumorokban, immunológiai, anyagcsere, illetve neurodegeneratív betegségekben ^{85,87-89}. Ezzel összhangban számos transzmembrán fehérje esetén kimutatták azok funkcionális szempontból releváns lipídutaj lokalizációját, így $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v2.1$, $K_v4.2$, $K_v7.1$, $K_v10.1$, $K_v11.1$, $Nav1.8$, $Nav1.9$ és TRPM8 (tranzien receptorpotenciálú csatorna, melasztatin alcsoport 8. tagja) ioncsatornák esetén, valamint egyéb transzmembrán fehérjékben, így nikotiner acetilkolin receptoroknál (nAChR), Na^+K^+ ATPáznál, β_2 -adrenerg receptoroknál, CXCR4, metabotrop glutamát receptoroknál, CB1 endokannabinoid receptoroknál, opioid receptoroknál és ErbB fehérjéknél, amint azt a témában írt összefoglaló közleményünkben részletesen bemutattuk ⁹⁰.

1.6 A koleszterin és a K_v ioncsatornák közötti kölcsönhatások bemutatása

A koleszterin és transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák közötti kölcsönhatások mechanizmusait három fő csoportba sorolhatjuk (**3. ábra**). Az első csoportba tartoznak azok a kölcsönhatások, amikor a koleszterin, mint ligand kötődik az ioncsatorna specifikus koleszterinkötő motívumaihoz, régióikhoz, vagy doménjeihez, ami eredményeként a csatorna kapuzását módosítja (**3A ábra**). A másik lehetséges kölcsönhatási típus olyan indirekt, a membrán biofizikai paramétereinek a megváltoztatásán keresztül végbemenő kölcsönhatásokat foglal össze, ahol a koleszterin elsődlegesen a membrán mint közeg tulajdonságait változtatja meg, aminek eredményeként a benne levő transzmembrán fehérjék működése is módosul (**3B ábra**). A harmadik mechanizmus a lipídutajok által mediált kölcsönhatás, ami nem különíthető el teljesen a direkt és indirekt kölcsönhatásoktól, hanem azok egyfajta közös metszéspontjaként képzelhető el (**3C ábra**). A lipídutajok ugyanis más membránrégiókhöz képest magasabb koleszterin koncentrációval rendelkeznek, és sokszor bennük az egyes membránfehérjék, így bizonyos ioncsatornák koncentrációja is magasabb (pl. $K_v1.3$, $K_v10.1$), ami a direkt

kölcsönhatások kialakulásának kedvez. Ezek mellett a lipidtutajokban pont az eltérő membránösszetétel miatt a membrán biofizikai paraméterei is eltérőek, ami az indirekt kölcsönhatások jelentőségét is valószínűsíti. A további alfejezetekben ezeket a kölcsönhatásokat mutatjuk be részletesen.



3. ábra A koleszterin transzmembrán fehérjékre gyakorolt hatásának lehetséges mechanizmusai

Az ábra **A**, **B** és **C** panelje azt mutatja be, hogy a koleszterin a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák működését is, három fő szinten módosíthatja. **(A)** A koleszterin befolyásolhatja a fehérje szerkezetét és funkcióját oly módon, hogy direkt kölcsönhatást alakít ki annak bizonyos régióival. A koleszterin kötődhet a protein (az ábrán Kir2.2 ioncsatorna) egy speciális koleszterin kötő szekvenciájához, mint amilyen például a CRAC (narancssárga) és a CARC motívumok (sárga). Továbbá a fehérje egyéb régiói, doménjei is képesek lehetnek közvetlen koleszterin-kötőhelyek kialakítására (lila és rózsaszín). **(B)** A direkt kölcsönhatás alternatívájaként a koleszterin kifejtheti transzmembrán fehérjékre (sötétkék henger) gyakorolt hatásait indirekt módon a membrán biofizikai paramétereinek, így rendezettségének (S), vastagságának (d) vagy az elasztikus kompresszibilitási (K_c), valamint görbületi (K_b) modulusával jellemezhető rigiditásának megváltoztatásán keresztül is. **(C)** A hatás harmadik lehetséges szintjének megfelelően a koleszterin módosíthatja a fehérjék lipidtutajok (azaz vastagabb membrán régiók) és nem-tutaj mikrodomének közötti megoszlását (sötétkék henger, kétfejú nyíl), megváltoztatva ezáltal a tutajban lokalizált (zöld henger) vagy azokkal asszociált (világoskék), illetve nem-tutaj doménekben található (piros henger) fehérjékkel való kölcsönhatásainak hatékonyságát. A tutajok által kifejtett hatás nehezen különíthető el a direkt és indirekt kölcsönhatásoktól, azok metszéspontjában található, ugyanis a tutajokban azok magasabb koleszterin-tartalma, valamint eltérő biofizikai tulajdonságai és fehérjekörnyezete révén mind a direkt, mind pedig az indirekt kölcsönhatások szerepe jelentős lehet.

1.6.1 A koleszterin és fehérjék közötti direkt kölcsönhatások: koleszterinkötő motívumok, régiók és domének

A transzmembrán fehérjék esetén az első olyan motívum, amelynek szerepét felvetették a fehérjék koleszterinnel való közvetlen kölcsönhatásában a Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus (CRAC) motívum volt, amely aminosavak speciális, jóllehet lazán definiált sorrendjét jelenti. A szekvencia sorrendje $(L/V)-X_{1-5}-(Y)-X_{1-5}-(K/R)$, ahol az X szimbólum bármely aminosavat jelentheti ^{68,91}. Később a fordított irányú, CARC -nak („reverse or mirror version of the CRAC” koleszterinkötő motívum) elnevezett $(K/R)-X_{1-5}-(Y/F)-X_{1-5}-(L/V)$ szekvenciáról is leírták, hogy szerepet játszhat a koleszterin megkötésében ^{68,91,92}, sőt, ioncsatornák esetén energetikailag kedvezőbbnek is bizonyult a koleszterin kötődésének szempontjából ⁶⁸. A harmadik, koleszterinkötésben fontos szekvencia, a Cholesterol Consensus

Motif (CCM) létrehozásában két szomszédos alegység vesz részt oly módon, hogy a kötőhelyet az egyik hélix (K/R)(I/L/V)(W/Y) szekvenciája és a szomszédos hélix (F/Y/W) aminosavjai alakítják ki ^{68,91,93}. Ezen motívumok megtalálhatóak számos fehérjében, így K_v, BK („big potassium = large conductance calcium-activated potassium channel” feszültség és kalcium által aktivált nagy konduktanciájú káliumcsatorna), Kir („inward rectifier potassium channel” befelé egyenirányító káliumcsatorna), Nav1.9, TRPV1 (tranziens receptorpotenciálú csatorna, vanilloid alcsoport 1. tagja) és TRPV4 (tranziens receptorpotenciálú csatorna, vanilloid alcsoport 4. tagja) csatornáknban, nAChR-ban, ABCG1 („ATP-binding cassette sub-family G member 1” ATP-t kötő kazettát tartalmazó fehérjecsald G alcsaldjának 1. tagja) és ABCG2 („ATP-binding cassette sub-family G member 2” ATP-t kötő kazettát tartalmazó fehérjecsald G alcsaldjának 2. tagja) transzporterekben, valamint különböző G-fehérjéhez kapcsolt receptorokban ⁹⁰. Ezek a motívumok a fehérjék transzmembrán és/vagy sejtplazmai doménjeiben helyezkednek el és sok esetben ezek a koleszterin hatások legfontosabb meghatározói. A három motívumban közös, hogy aminosavai a koleszterin molekulával hidrofób kölcsönhatásokat (a koleszterin alkil csoportja és a motívum izoleucinja, leucinja és valinja között), hidrogénkötéseket (a koleszterin hidroxil csoportja és a motívum pozitív töltéssel rendelkező argininje, lizinje között), valamint a koleszterin gyűrűje és a motívum aromás hidrofób aminosav oldalláncai között létrejövő kötésekkel alakíthatnak ki ⁹⁴.

Az utóbbi években azonban számos kritika merült fel azzal kapcsolatban, hogy ezek a motívumok mennyire meghatározók a koleszterin által kiváltott hatások szempontjából ^{95,96}. A CRAC és CARC definíció szerint lineáris aminosavszekvenciát tartalmazó motívumok, így alkalmazhatóságuk limitált a fehérjék háromdimenziós szerkezete miatt, illetve nem magyarázzák a több alegység által létrehozott kötőhelyek kialakulását. A másik ellentmondás, hogy bizonyos fehérjéknél, így K_v ⁹⁷, Kir ^{98,99}, BK ¹⁰⁰ vagy P2X ¹⁰¹ ioncsatornák esetén a motívumok a csatornák citoszolikus doménjeiben találhatóak, így valószínűtlen, hogy azok mediálják az integráns membránlipid koleszterinnel való kölcsönhatásait. Ennek ellenére K_v ⁹⁷ és BK ¹⁰⁰ esetén kimutatták, hogy ezek a citoplazmatikus motívumok nélkülözhetetlenek a koleszterinnel való kölcsönhatásban, hiszen a csatornák ezen régióinak eltávolítása után a koleszterin nem képes a jól ismert módon befolyásolni a csatornák funkcióját. A Kir2.1 ioncsatornában kimutatták, hogy a CRAC, CARC és CCM szekvenciákon alapuló koleszterinkötő motívumok nem mutatnak átfedést az MD szimulációk és dokkolások során azonosított koleszterint kötő régiókkal. A számítások alapján Kir csatornáknban két koleszterint érzékelő nagyobb fehérjerégió definiálható ^{99,102}, amelyekben belül különböző kötőhelyeket találtak számítógépes szimulációk során ¹⁰³. Mivel más fehérjékben, így nAChR, GABA_A

(„gamma-aminobutyric acid” gamma-aminovajsav receptor A típusa), ABCG2 és GPCR („G protein-coupled receptor” G-proteinhez kapcsolt receptor) esetén is kimutatták, hogy számos CRAC és CARC motívum nem funkcionál koleszterin-kötőhelyként, egyéb módon definiálták a fehérjék koleszterinre érzékeny régióit, amelyek több esetben különböznek a korábban leírt koleszterint kötő motívumoktól ⁹⁰.

Újabb számítások és kísérletes eredmények arra mutattak rá, hogy a három fentebb említett koleszterinkötő motívum a koleszterin hatását mediáló és koleszterint kötő régiók csak egy részének kialakításáért felelősek ⁹⁴. Emiatt a koleszterinkötésében fontos régiók általános definícióját kiterjesztették. Az új elméletek továbbra is azt hangsúlyozzák, hogy a koleszterin kötésében fontos az erőteljesen hidrofób környezet, amely lehetővé teszi a koleszterin stabil kapcsolódását annak gyűrűje és az aromás/hidrofób aminosavak közötti kölcsönhatások révén, valamint a koleszterin hidroxil csoportja és különböző aminosavak között képződő hidrogénkötések kialakulásán keresztül. A koleszterint kötő aminosavak azonban az új értelmezések szerint nem csak egy lineáris szekvencia mentén helyezkedhetnek el a fehérjén belül, így a CRAC és CARC motívumok meglétével kapcsolatos egyik legfontosabb limitáló tényező eliminálásra került az új definíciókban ⁹⁴.

A koleszterinre érzékeny régiók mellett bizonyos fehérjék esetén, (pl. ABC transzporterek, Niemann-Pick fehérje, Patched) külön koleszterinkötő domének felelősek a koleszterinnel való interakciók kialakításáért ¹⁰⁴, de ezek száma lényegesen limitált a koleszterinkötő régiókhoz képest.

1.6.2 A koleszterin és fehérjék közötti indirekt kölcsönhatások

A direkt kölcsönhatások mellett a koleszterin a membrán biofizikai paramétereinek, így rendezettségének, hidrációjának, vastagságának, görbületének, illetve dipólpotenciáljának megváltoztatásán keresztül is befolyásolhatja a fehérjék működését. Már a korai vizsgálatok során kiderült, hogy a koleszterin jelentősen módosítja modellmembránok lipidjeinek rendezettségét. A hatás kettős természetű, gél fázisú membránokban ugyanis a rendezettséget jellemző paramétereket csökkenti, míg a biológiai membránokra jellemző folyékony fázisban a membránt felépítő lipidek oldalláncainak rendeződését, a láncok kiegyenesedését és a lipid molekulák átlagos keresztmetszetének csökkenését eredményezi ^{105,106}. A rendezettség növekedésével párhuzamosan a membrán fluiditása, és következményesen a membrán alkotóelemek mobilitása jelentősen lecsökken szterolok hatására ¹⁰⁷. A fluiditás csökkenése nemcsak modellmembránok, hanem élő sejtek esetén is megfigyelhető ¹⁰⁸. A koleszterin által

okozott rendeződéssel párhuzamosan a vízmolekuláknak a membrán mélyebb rétegeibe történő bejutása, azaz a membrán hidrációja is lecsökken ¹⁰⁹.

Amint az a rendezettséget fokozó hatásból várható, a koleszterin mennyiségének emelkedése a membránok vastagságának növekedését is eredményezi ^{106,110}. A membrán vastagsága fontos a fehérjék aktivitásának szabályozása szempontjából. A fehérje-lipid kölcsönhatások során meghatározó jelentőségű tényező ugyanis a fehérjék és lipidek hidrofób régióinak hossza, illetve elsősorban az azok közötti különbség, amelyet a hidrofób „mismatch” elmélet foglal össze. Eszerint egy fehérjékből és lipidekből álló rendszer szabadenergiája a molekulák összekeveréséből fakadó entrópiaváltozásból és a lipidek és fehérjék közötti kölcsönhatást jellemző energiatényezőből származik. Az utóbbi tényező komponensei a van der Waals kölcsönhatások, a hidrogénkötések energiája, a hidrofób mismatch-ből eredő ún. hidrofób effektus, illetve a lipid oldalláncok elasztikus deformációjából származó szabadenergia. A komponensek összességéből számított szabadenergia-változás optimális (azaz a lehető legkevésbé pozitív), amennyiben a fehérjék és lipidek hidrofób doménjeinek hossza megegyezik. Ha azonban a fehérje hidrofób részének hossza (hidrofób hossz) a lipidek hidrofób részénél hosszabb („pozitív mismatch”) vagy rövidebb („negatív mismatch”) a kedvezőtlen energia változás ellensúlyozására adaptációs folyamatok indulnak be. Ilyen alkalmazkodási mechanizmus lehet a fehérjék asszociációja, transzmembrán hélixek elhajlása, konformációjának megváltozása, illetve a lipid oldalláncok hosszának módosulása vagy a lipidek asszociációja és membrán-mikrodomének következményes kialakulása ^{78,111}. A koleszterin jelenléte jelentősen befolyásolhatja ezen adaptációs folyamatokat. A koleszterin hiánya esetén a membrán lecsökkent vastagsága például alacsonyabb hidrofób hosszal jellemezhető konformációk kialakulását segítheti elő. A koleszterin által megnövelt membránvastagság ezzel szemben a nagyobb hidrofób hosszal rendelkező fehérjekonformációk stabilitását növelheti, illetve nagyfokú mismatch esetén a proteinek aggregációját, valamint más fehérjékhez való kötődését okozhatja. Mivel a fehérjék különböző konfigurációi jellemzően eltérő funkcionális aktivitással bírnak, a koleszterinfüggő membránvastagságból fakadó adaptációs mechanizmusok jelentősen módosíthatják a transzmembrán fehérjék aktivitását, amit ki is mutattak BK és Nav csatornák, nAChR, Na⁺-K⁺ ATPáz, különféle GPCR-ek, valamint ErbB fehérjék esetén, amint azt részletesen áttekintettük összefoglaló közleményünkben ⁹⁰.

A biológiai membránok fontos biofizikai paramétere azok görbülete és az abból fakadó görbületi elasztikus energia. A membránok teljes vastagságában jellemző a molekulák között fellépő vonzó és taszító erők egyensúlya, amely révén energetikailag optimális egyensúlyi távolság alakul ki a molekulák között. Amennyiben az egyensúlyi távolság értéke különböző a

membrán felszíni és középső régióiban, a membrán spontán módon begömbül. Ha azonban ez nem lehetséges szterikus okok (például hidrofób mismatch) miatt, görbületi elasztikus stressz és következményesen pozitív szabadenergia-változás alakul ki. A fehérjék konformációtól függő módon csökkenthetik vagy növelhetik ezen stressz mértékét, illetve az elasztikus stressz mértékétől függően megváltozhat a fehérjék különböző konfigurációinak stabilitása, így azok funkcionális aktivitása is ^{78,112}. A koleszterin mennyiségének növelése fokozza a membránok kompressziós és görbületi rigiditását ^{113,114}, megváltoztatja a membrán különböző mélységeiben a vonzó és taszító erők egyensúlyát jellemző laterális nyomásprofil ¹¹⁵, valamint jelentősen módosítja a membránok spontán görbületét ^{116,117}. Ezen hatásokon keresztül a koleszterin módosíthatja a fehérjék adott konfigurációjának stabilitását, ami konformáció-változást, illetve az asszociációs hajlam módosulását eredményezheti ^{112,118}. Ilyen, a membrán elaszticitásban bekövetkező változások szerepét valószínűsítették a koleszterin hatásainak hátterében rodopszin, szerotonin receptorok, ErbB fehérjék és mechanoszenzitív Piezo csatornák funkciójának vizsgálata során ⁹⁰.

A membránok kevésbé ismert biofizikai paramétere a dipólpotenciál (DP), ami a membránt alkotó lipidek és a membránhoz asszociált vízmolekulák dipóljainak nem véletlenszerű térbeli orientációjából származik. Ez az elrendeződés nagy pozitív (150-450 mV) elektromos potenciál és 10^8 - 10^9 V/m erősségű intramembrán elektromos tér kialakulását eredményezi ^{119,120}. A DP nagyságának meghatározója a membrán lipidösszetétele, illetve elsősorban a koleszterin mennyisége. A koleszterin ugyanis jelentős mértékben növeli a DP nagyságát, amelynek oka egyrészt a molekula nagy dipólusmomentuma, az általa okozott rendezettségbeli fokozódás, illetve a membrán dielektromos állandójának megváltozása ^{121,122}. Mivel a fehérjékben a töltésmegoszlás egyenetlen, ezért a DP az általa generált elektromos erőtér révén jelentősen módosíthatja a proteinek konformációinak stabilitását és ezáltal azok aktivitását is, amint azt ki is mutatták feszültségkapuzott ioncsatornák, Na⁺-K⁺ ATPáz, ABCB1 („ATP-binding cassette sub-family B member 1” ATP-t kötő kazettát tartalmazó fehérjecsalád B alcsaládjának 1. tagja), szerotonin receptorok, valamint ErbB fehérjék esetén ⁹⁰.

1.6.3 A koleszterin és membránfehérjék közötti direkt és indirekt kölcsönhatások elkülönítése

Annak ellenére, hogy a sejtmembrán koleszterinnel való töltésének funkcionális és elektrofiziológiai hatásai számos ioncsatorna, transzporter és transzmembrán receptor esetén igen jól dokumentáltak, a hatások mechanizmusának meghatározása, azaz a direkt és indirekt koleszterin hatások elkülönítése bonyolult. Nehéz különválasztani ugyanis a közvetlen kötődés

és a szterolok által a membrán biofizikai paramétereiben bekövetkező változások következményeit.

Erre a problémára ad részben megoldást a koleszterin királis analógjainak, az epi- és ent-koleszterinnek az alkalmazása. Az epi-koleszterin csupán annyiban különbözik a koleszterintől, hogy a C3 hidroxil csoportja a 3α pozícióban található (a koleszterinben megfigyelhető 3β helyett), míg az ent-koleszterin a koleszterin tükörképe, mivel a vegyület mind a nyolc sztereocentrumának konfigurációja a koleszterinhez képest ellentétes^{107,123}. Ezen különbségek miatt a molekulák háromdimenziós szerkezete jelentősen különbözik a koleszterinétől, amelynek eredményeképpen a fehérjékre gyakorolt funkcionális hatásaik is jelentősen eltérőek lehetnek, annak ellenére, hogy csak kismértékű különbségeket mutatnak az alapvető membránbiofizikai tulajdonságokra gyakorolt hatásaik tekintetében^{98,107,123,124} (lásd még lentebb). Ezzel összhangban Kir^{125,126}, TRPV1¹²⁷, BK¹²⁸ csatornák, valamint GABA_A¹²⁹ receptorok esetén is kimutattak sztereospecifikus hatásokat, azaz ezeknél a fehérjéknél a királis analóg a koleszterintől különböző vagy éppen azzal ellentétes funkcióbeli változásokat váltott ki. A nAChR koleszterin általi szabályozása ezzel szemben nem sztereospecifikus módon történik, a koleszterin és izomerjei ugyanis hasonló funkcionális hatásokat okoznak¹³⁰. A korábbi elméletek szerint a sztereospecifikus (különböző vagy ellentétes) hatások hátterében leginkább a szterolok közvetlen fehérjéhez kötődése áll, míg a nem sztereospecifikus (hasonló) hatásokat a koleszterin és analógjai indirekt mechanizmusokon keresztül fejtik ki.

Újabb eredmények azonban a királis analógok használatának limitációira hívták fel a figyelmet. Amint azt nAChR esetén újabb tanulmányok leírták, annak ellenére, hogy a koleszterin és analógjai hasonlóan befolyásolják a fehérje funkcióját, valószínűleg a hatás hátterében direkt kölcsönhatás állhat, ugyanis kimutatták, hogy a koleszterin és királis analógjai a nAChR egy „laza koleszterint kötő helyére” kötődhetnek¹³¹. Ezen eredmények arra utaltak, hogy a korábbi elméletekkel ellentétben a sztereospecifitás hiánya nem zárhatja ki a közvetlen fehérje-koleszterin kölcsönhatás meglétét, így a sztereoizomerek használata elsősorban akkor alkalmas a direkt és indirekt hatások elkülönítésére, ha a koleszterin és izomerjei különböző vagy ellentétes hatásokat gyakorolnak a fehérje funkciójára, ez ugyanis a direkt koleszterin-fehérje interakció meglétét valószínűsíti^{98,123}. Emellett Kir csatornáknál, ahol a koleszterin és izomerjeinek hatása sztereospecifikus (a koleszterin áramcsökkenést, az epi-koleszterin áramnövekedést okoz, míg az ent-koleszterinnek nincs hatása az áram nagyságára), kimutatták, hogy a koleszterin és az izomerek a molekula ugyanazon kötőhelyéhez kapcsolódnak, csak az egyes vegyületek kötőhelyen belüli orientációja különbözik, emiatt az izomerek hatása eltér a koleszterin által kiváltott hatásokhoz képest^{98,103}.

A koleszterin és izomerjei háromdimenziós szerkezetében megfigyelhető eltérések miatt a lipid kettősrétegekben az egyes vegyületek vertikális pozíciója is különbözik. Az ent-koleszterin elhelyezkedése a tükörképi szerkezetének megfelelően majdnem teljesen hasonló, mint a koleszteriné, az epi-koleszterin azonban a másik két származékhoz képest a membrán síkjában felfelé, annak interfaciális rétege felé eltoltan és ferde állásban található^{123,132}. Ennek eredményeképpen a kettős réteg lipidrendezettségére gyakorolt hatásaik kismértékben eltérnek¹²⁴. Így a királis analógok membránparaméterekre gyakorolt hatásainak pontos leírása további vizsgálatok igényét veti fel¹²³. Az említett hátrányok ellenére a királis izomerek használata továbbra is az egyik legalkalmasabb módszer a direkt és indirekt koleszterin-fehérje kölcsönhatások elkülönítésére könnyű alkalmazhatóságuk és membránfehérjék sokféle típusával való kompatibilitásuk miatt.

Az általunk is alkalmazott kételektrodás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF) technika az elektrofiziológiai és fluoreszcenciás módszerek egyedi kombinációja. Használata során a VSD és a PD átrendeződését egyidejűleg monitorozhatjuk a kapuzási folyamat során, így a koleszterin fő intramolekuláris célpontja (VSD vagy PD) könnyen meghatározhatóvá válik¹³³. Bár önmagában a TEVCF segítségével nem különíthetők el egymástól a direkt és indirekt kölcsönhatások, a módszer fontos információt nyújthat a koleszterin intramolekuláris célpontjáról a funkcionális domének szintjén, akkor is, ha az adott fehérje nem rendelkezik specifikus koleszterinkötő motívumokkal, régiókkal vagy doménekkal. A módszert sikeresen alkalmazták PUFA („polyunsaturated fatty acid” többszörösen telítetlen zsírsav) vegyületek intramolekuláris célpontjának meghatározására különböző K_V ioncsatornák esetén, koleszterin által okozott hatásokat viszont eddig nem vizsgálták ezzel a módszerrel¹³⁴.

Az elmúlt évek során a krio-elektronmikroszkópia és a molekuláris dinamikai szimulációs technikák fejlődése révén számos új koleszterin-kötőhelyet azonosítottak, ami jelentősen kibővítette a direkt koleszterin-fehérje kölcsönhatásokkal kapcsolatos ismereteinket. Bár ezek a módszerek a direkt kölcsönhatások meglétét erősen valószínűsíthetik, nem tudják azokat egyértelműen bizonyítani. A feltételezett kölcsönhatások funkcionális relevanciájának megerősítése további kísérletes bizonyítást igényel, például úgy, hogy a lehetséges kötőhelyen mutációt hozunk létre, ami módosíthatja a fehérje koleszterinnel való kölcsönhatását.

1.7 A koleszterin K_V ioncsatornákra kifejtett hatásai és azok mechanizmusa

A koleszterin K_V csatornák funkciójára gyakorolt hatásait először a csatornák és a lipidtutajok közötti kapcsolat vizsgálata során vetették fel. A $K_{V1.3}$, $K_{V1.4}$, $K_{V2.1}$, $K_{V4.2}$, $K_{V7.1}$, $K_{V10.1}$ és $K_{V11.1}$ csatornákról is kimutatták, hogy azok preferenciálisan a lipidtutajokban találhatóak⁹⁰, amelynek oka egyrészt az, hogy a csatornák hidrofób doménjeinek hossza a lipidtutajok vastagságához hasonló. Másrészt a tutajbéli lokalizáció hátterében állhatnak specifikus fehérje-lipid kölcsönhatások vagy az ioncsatornák kötődése a tutajokban található egyéb fehérjékhez, úgymint a PDZ doménnel rendelkező fehérjékhez¹³⁵, kaveolinhoz¹³⁶, kiegészítő KCNE alegységekhez¹³⁷. A lipidtutajbéli elhelyezkedés funkcionális szempontból releváns lehet limfocitákban a $K_{V1.3}$ immunológiai szinapszisba jutása¹³⁸ és a következményes Ca^{2+} -jel kialakulása során¹³⁹. A tutajbéli lokalizáció általánosságban gátló hatást fejt ki a csatornák funkciójára, bár ezzel párhuzamosan a mikrodoménekre jellemző facilitált klaszterizációs folyamatok elősegíthetik a csatornák jelátviteli folyamatokban történő részvételét, amelyek függetlenek az ionáramtól^{140,141}.

A K_V csatornák és koleszterinben gazdag mikrodomének közötti szoros és sokrétű kapcsolat felderítése indította el a koleszterin és K_V csatornák közötti kölcsönhatások vizsgálatát. Kimutatták, hogy mind a membrán koleszterintartalmának növelése, mind pedig annak csökkentése megváltoztatja a csatornák feszültségfüggő egyensúlyi aktivációs és inaktivációs folyamatait, valamint az aktivációs és inaktivációs időállandók nagyságát $K_{V1.3}$, $K_{V10.1}$, $K_{V1.5}$ és $K_{V2.1}$ csatornák esetén¹⁴²⁻¹⁴⁴, a koleszterin általánosságban gátolja ezeknek a K_V csatornáknak a működését. Ezzel szemben a $K_{V7.2}/K_{V7.3}$ csatornáknak azt valószínűsítették, hogy a megfelelő csatornaműködéshez optimális koleszterinkoncentrációra van szükség: ugyanis nemcsak a koleszterin depléciója, hanem érdekes módon annak akkumulációja is lecsökkentette az ionáramok nagyságát¹⁴⁵. Ezzel szemben minden egyéb K^+ -ot vezető csatorna esetén a sejtmembránban a koleszterin depléciója (továbbiakban koleszterin depléció) és a sejtmembrán koleszterinnel történő töltése (továbbiakban koleszterin töltés) ellentétes hatást váltott ki. Az ellentmondás hátterében az állhat, hogy a fent említett tanulmányban a sejtek kezelése a koleszterintartalom növekedését okozó M β CD-koleszterin komplexszel a patch-clamp mérések során a sejtek direkt perfúziójával történt, nem pedig a hagyományosnak számító, általunk is alkalmazott, mérést megelőző, egy órás inkubációval. A kiváltott áramcsökkenést a kezelés azonnali hatásaként értelmezték, bár kérdéses, hogy ilyen rövid időskálán elegendő mennyiségű koleszterin képes beépülni a sejtmembránba.

A $K_{V1.3}$ aktivációs kinetikájának koleszterin által okozott lassulása hátterében kezdetben a membrán koleszterintartalmának emelése által okozott megnövekedett viszkozitás hatását valószínűsítették, a feltételezések szerint ugyanis a súrlódási erők nagyságának

növekedése gátolhatja a csatorna aktivációja során a VSD konformációváltozásainak végbemenetelét ¹⁴⁴. A későbbiekben a koleszterin K_V csatornák kapuzási paramétereire gyakorolt hatásaiban felvetették a koleszterin és a csatornafehérjék közötti direkt kölcsönhatások szerepét, amelyeket elsősorban a K_V csatornák szekvenciájában általánosan előforduló CRAC és CARC motívumok mediálhatnak. A $K_V1.3$ szekvenciájában összesen két CRAC és öt CARC található, amelyek közül az összes CRAC, valamint a CARC1-3 motívumok az N-terminális doménben vagy a transzmembrán hélixekben helyezkednek el, míg az utolsó két CARC a csatorna C-terminális végén intracellulárisan található ¹⁴⁶ (**1B ábra** narancssárga és sárga ovális alakú kontúrok). Ezzel összhangban kimutatták, hogy a csatorna CARC4 és CARC5 motívumot (**1B ábra** sárga oválisok) tartalmazó C-terminális végének eltávolítása teljesen megakadályozza a koleszterin által indukált elektrofiziológia változások kialakulását ¹⁴⁶, ugyanakkor nem befolyásolja érdemben a kapuzási paramétereket ¹³⁵. A hatás feltételezett mechanizmusa szerint e két intracelluláris CARC motívum az azokban található hidrofób aminosavak segítségével direkt kölcsönhatást alakíthat ki a membránban található koleszterinnel, amely a csatorna kapuzási paramétereinek megváltozását eredményezi, de ezt kísérletesen még nem bizonyították.

1.8 A $K_V1.3$ és $K_V10.1$ ioncsatornák fiziológiás folyamatokban és betegségekben betöltött szerepeinek összefoglalása

A $K_V1.3$ ioncsatorna jelentősége fiziológiás körülmények között elsősorban az immunsejtek, különösen a T- és B-limfociták aktivációjának szabályozásában játszott szerepéből fakad ^{147,148}. Humán B-sejtekben nyugalmi állapotban kevés $K_V1.3$ fordul elő, izotípusváltás után memória sejtekben azonban expressziójuk megnő és jelentős szerepet játszanak ezen sejtek aktivációjában ¹⁴⁹. Humán T-limfocitákban funkcionális szempontból a káliumcsatornák közül a $K_V1.3$ és $K_{Ca}3.1$ jelenléte nélkülözhetetlen. Nyugalmi állapotban a sejtmembránban kb. 500 $K_V1.3$ és 10-20 $K_{Ca}3.1$ fordul elő, míg aktiváció során naív, illetve centrális memória sejtekben a $K_{Ca}3.1$, effektor memória sejtekben pedig a $K_V1.3$ expressziója nő meg, utalva ezen csatornák funkcionális jelentőségére ¹⁵⁰. Ezzel összhangban ezen sejtekben a membránpotenciál szabályozásáért és azon keresztül az aktiváció során megjelenő, azt lehetővé tevő megfelelő Ca^{2+} -jel kialakulásáért felelősek ¹⁵¹. A $K_V1.3$ kifejeződik a központi idegrendszer mikroglia sejtjeiben is, ahol szintén a sejtek aktivációjában és citokin szekréciójában van fontos szerepe ¹⁵². Emellett $K_V1.3$ csatornák a mitokondrium belső membránjában is találhatóak, amelyeknek a limfociták apoptózisában lehet jelentőségük ¹⁵³.

A Kv1.3 megnövekedett expressziójával összhangban ezen csatornák patofiziológiai szempontból fontosak olyan kórképekben, amelyekben az effektor memória sejtek meghatározó jelentőséggel bírnak. Így sclerosis multiplexben¹⁵¹, I. típusú diabetes mellitusban¹⁵¹, rheumatoid arthritisben¹⁵¹, szisztémás lupus erythematosusban¹³⁹, psoriasisban¹⁵⁴, colitis ulcerosaban¹⁵⁵, valamint asthma bronchialeban¹⁵⁶ is kimutatták, hogy a betegség patomechanizmusában fontos T-limfocitákban emelkedett a csatorna expressziója, ezáltal a sejteken mért K⁺-áramok amplitúdója, valamint következményesen a kialakuló Ca²⁺-jel nagysága, a sejtek proliferációja és a proinflammatorikus citokinek szekréciójának mértéke. A Kv1.3 szerepét az elhízásban megfigyelhető inzulin rezisztencia kialakulásában is felvetették állatkísérletek során, amelyekben a csatorna expressziójának lecsökkentése részben kivédte a diéta indukálta obezitás és inzulin rezisztencia kialakulását¹⁵⁷. A Kv1.3 megnövekedett expresszióját leírták Alzheimer-kóros betegek frontális agykérgéből származó mintákban is, valamint a csatorna pozitív kolokalizációt mutatott az amiloid plakkok lokalizációjával¹⁵⁸.

A csatorna kifejeződésének effektor memória limfocitákra, illetve mikrogliaakra specifikus megnövekedése lehetővé teszi, hogy a Kv1.3 funkciójának szelektív gátlása révén kedvezően befolyásoljuk ezen kóros állapotok lefolyását, amelyet ki is mutattak a betegségek modellrendszereiben a csatornára specifikus gátlószerek alkalmazásával. A csatorna gátlására terápiásan elsősorban skorpiótoxinokat, illetve mesterséges kismolekulájú inhibitorokat használnak. *In vitro* vizsgálatok során, illetve állatkísérletekben a skorpiótoxinok közül például különféle módosított ShK toxinok kedvező hatásának bizonyultak a sclerosis multiplex, az I. típusú diabetes mellitus, illetve a rheumatoid arthritis¹⁵¹, az allergiás kontakt dermatitis¹⁵⁹, a szisztémás lupus erythematosus¹³⁹, a colitis ulcerosa¹⁵⁵, valamint az asthma bronchiale¹⁵⁶, a HsTx1 pedig késleltetett típusú hiperszenzitivitási reakció¹⁶⁰ modellrendszereiben, gátolva az effektor memória fenotípusú T-limfociták proliferációját, aktivációját, citokin termelését, valamint az *in vivo* gyulladós folyamatok kialakulását. A kismolekulájú gátlószerek közül az ADWX-1 a sclerosis multiplex¹⁶¹, a PAP-1 a colitis ulcerosa¹⁵⁵ és a psoriasis¹⁵⁴ modelljeiben bizonyult hatékonynak. *In vitro* kísérletek, valamint egérmódelben nyert adatok alapján a mikrogliaokban található Kv1.3 csatornák PAP-1 inhibitorral történő gátlása kedvező volt a β -amiloid plakkok kialakulása, aggregációja, valamint a következményes proinflammatorikus állapot megakadályozása szempontjából¹⁵².

A Kv10.1 csatorna fiziológias körülmények között gyakorlatilag kizárólag a központi idegrendszer különböző régióiban fejeződik ki, pontos funkciója azonban jelenleg nem ismert¹⁶². Patkányokban végzett kísérletek szerint a nigrostriatalis rendszer dopaminerg neuronjaiban lehet szerepe az elektrofiziológiai aktivitás mintázat szabályozásában¹⁶³. Kv10.1 knockout

egerekben ugyanakkor a csatorna hiánya kismértékű hiperaktivitást leszámítva nem eredményezett semmilyen jelentős fejlődésbeli, neurológiai, kognitív vagy szociális viselkedésbeli eltérést ¹⁶⁴. Újabb eredmények alapján a fehérje fokozott aktivitást (azaz alacsonyabb aktivációs küszöböt, lassult deaktivációt) eredményező mutációja szerepet játszhat az intellektuális zavarokkal, epilepsziával és fejlődési rendellenességekkel járó Temple-Baraitser szindróma ¹⁶⁵, valamint az arcdiszmorfiával, intellektuális zavarokkal és hypertrichosissal jellemezhető Zimmerman-Laband szindróma ¹⁶⁶ patogenezisében. A K_v10.1 csatorna patofiziológiai szempontból legfontosabb és leggyakoribb eltérése azonban a tumorok mintegy 70%-ában megfigyelhető fokozott expressziója ^{167,168}, ami a vaszkularizáció és migráció fokozásán, valamint a sejtciklus fázisai közötti átmenetek serkentésén keresztül a daganatok progresszióját segíti ^{162,169}. Mindezek alapján felvetődik a K_v10.1 tumormarkerként, prognosztikai faktorként, valamint terápiás célpontként való alkalmazása ¹⁶⁹, bár az ezekkel kapcsolatos vizsgálatok még folyamatban vannak. A csatorna nem-specifikus módon gátolható imipramin, astemizol, valamint quinidine vegyületekkel, amelyek bizonyos tumorok esetén képesek a daganatos sejtek osztódását gátolni ¹⁶⁹. A csatorna specifikus módon gátolható K_v10.1 ellenes antitestek ¹⁷⁰, tengerirózsából származó APETx4 toxin ¹⁷¹, kígyóméregből izolált collinein-1 ¹⁷², illetve szőlőmagból kivont procyanidin B1 ¹⁷³ segítségével és ezek a specifikus inhibitorok is tumorelles hatásúnak bizonyultak *in vitro* körülmények között és állatkísérletekben, alátámasztva a fehérje gátlásának terápiás alkalmazhatóságát.

A K_v10.1 daganatképzést serkentő hatásaival kapcsolatban leírták, hogy azok elsődlegesen az ioncsatorna nonkanonikus funkcióinak tekinthetők, azaz a csatorna a K⁺-vezetőképességtől független módon, sejtosztódáshoz vezető intracelluláris jelátviteli útvonalak aktivációján ^{174,175}, illetve a belső magmembránban elhelyezkedve a heterokromatinnal történő kölcsönhatás segítségével a génexpresszió szabályozásán keresztül ¹⁷⁶ fejti ki hatásait. Hasonló nonkanonikus funkciók egyéb csatornák, így K_v1.3 esetén is felmerülnek, azonban ezek részletes vizsgálata még nem történt meg ^{90,140,141}.

Az 1.6 és 1.7 fejezetekben leírtak alapján a koleszterin, illetve származékai jelentős mértékben befolyásolják a különféle ioncsatornák, így a K_v1.3 és K_v10.1 működését. Ennek megfelelően a sejtmembrán szteroltartalmának megváltozásával járó betegségek esetén a csatornák funkcionális működése is módosulhat, amely akár a betegség kialakulása szempontjából is fontos lehet. A jól ismert hiperkoleszterinémia mellett a másik általunk vizsgált betegség, amelyben a szterolok szintje megváltozik, a Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindróma. Az ebben a kórban szenvedő betegek vérplazmájában és sejteinek membránjában a 7DHC felhalmozódik, ami alapvető tényező a betegség patomechanizmusa szempontjából ⁷⁰.

A betegség oka a 7-dehidrokolin-reduktáz enzim veleszületett defektusa, amely a 7DHC koleszterinné történő átalakítását végzi a koleszterin bioszintézisének utolsó lépése során ⁷⁰. Az enzim defektusa révén a prekursor 7DHC szintje megnő, míg a reakciótermék koleszterinnek a szintje lecsökken ¹⁷⁷. Az még nem tisztázott, hogy a klinikai tüneteket, ami magába foglalja az arcdiszmorfiát, mikrocefáliát, hipospadiázist, szomatomentális retardációt, illetve immunszuppressziót ⁷⁰, a 7DHC emelkedett szintje, annak toxicitása vagy a koleszterinszint csökkenése okozza ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. A betegség autoszomális recesszív módon öröklődik, monogénes, komplex malformációs szindróma, amelynek hátterében a 7-dehidrokoleszterin-reduktáz több, mint 150 mutációját azonosították ⁷⁰. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a betegek T-limfocitáiban, valamint egészséges sejtek 7DHC-val történő kezelése után a Kv1.3 csatorna kinetikai és egyensúlyi paraméterei megváltoznak, amely a limfociták aktivációjában és proliferációjában megfigyelhető eltérések megjelenéséhez vezet, amelyek pontos mechanizmusa azonban nem tisztázott ¹⁴⁶.

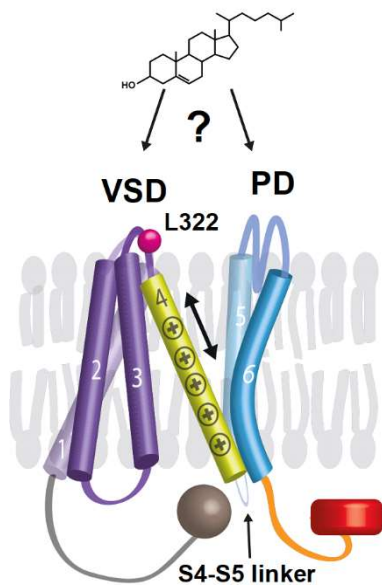
2. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a K_V ioncsatornák kapuzásának strukturális alapjai, főbb lépesei és a kapuzást befolyásoló tényezők alapvetően ismertek, a kapuzás finomhangolását biztosító több tényező ezidáig feltáratlan maradt a megfelelően módszerek hiányában. Munkánk során ezért a K_V csatornák aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuzásának eddig feltáratlan részleteit vizsgáltuk meg két fő kérdés mentén:

1. A K_V csatornák melyik doménje a membránban található szterolok elsődleges célpontja? A membránban található szterolok hatásukat a VSD-n keresztül fejtik-e ki, amelyek a későbbiekben áttevődnek a csatolási apparátusra, majd a PD régióira, vagy pedig elsődlegesen, közvetlenül ez utóbbiak valamelyikének működését befolyásolják (**4. ábra**)?
2. Az aktivációs kapu állapota meghatározza-e az egyensúlyi inaktiváció kialakulását és az inaktivációból történő visszatérést? A csatorna kapuzási állapotait is feltüntetve két alapvető kérdést vizsgáltunk: a zárt állapotú csatorna képes-e közvetlenül inaktiválódni negatív membránpotenciálok esetén, tehát lehetséges-e a $C \rightarrow CI$ átmenet (**5. ábra**, bal oldali piros nyíl), vagy a CI állapot az $OI \rightarrow CI$ útvonalon töltődik be negatív membránpotenciálok mellett is? Másrészt a nyitott-inaktiválódott csatornák (OI) a CI állapoton keresztül térnek-e vissza az inaktivációból, azaz, szükséges-e az aktivációs kapunak bezáródni ahhoz, hogy az inaktivációból történő visszatérés bekövetkezzen, vagy elképzelhető az $OI \rightarrow O$ útvonal a folyamat során, negatív membránpotenciál jelenléte mellett (**5. ábra**, jobb oldali piros nyíl)?

Az 1. célkitűzési pontban megfogalmazott, a membrán szterolok K_V ioncsatornákon belüli támadáspontjára vonatkozó problémára az eddigi kísérletek nem adtak választ, ugyanis a hagyományos patch-clamp mérésekkel csak az ionáramok mérhetők, a VSD kapuzás során bekövetkező mozgásáról közvetlenül nem kapunk információt. Ezáltal az egyszerű ionárammérések alapján a szterolok ioncsatornán belüli elsődleges célpontját nem tudjuk meghatározni. A kérdés megválaszolásához a dolgozatban bemutatott kísérletek során a kételektrodás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF) módszert alkalmaztuk, amely segítségével egyrészt a hagyományos patch-clamp mérésekhez hasonlóan képesek vagyunk az ionáramok mérésére, és ezáltal számos, a csatornát vagy annak kapuzását jellemző biofizikai paraméter meghatározására (pl. egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggése, nyitási

valószínűség, egyedi csatorna konduktancia, áram aktivációs és inaktivációs kinetikák). Ezentúl a TEVCF lehetőséget ad, hogy az ionáramok mérésével egyidőben a VSD mozgását leíró paramétereket is meghatározzuk (F_{norm} -V görbe és fluoreszcenciás jel aktivációs kinetikája). Ehhez a VSD S3-S4 linkerébe pontmutációval bevitt ciszteint egy ciszteinre specifikus fluoreszcens festékkel jelöljük meg. Az aktivációs kapuzás során a VSD-ben található S4-es hélix a membrán síkjából kifelé mozdul el, ami révén megváltozik a festék kvantumhatásfoka. A fluoreszcens jel intenzitásváltozása ezáltal jól tükrözi a VSD mozgását. A kísérleteket afrikai karmosbéka petesejtjeiben expresszált A309C K_v1.3 és L322C K_v10.1 humán ioncsatornákon végeztük. Az oocita expressziós rendszer biztosította számunkra a TEVCF mérésekhez szükséges nagy csatornaexpressziót. A szterol moduláció ioncsatornán belüli célpontjának és a hatások csatorna specificitásának meghatározásához a különböző kapuzási mechanizmussal rendelkező K_v1.3 és K_v10.1 csatornák esetén hasonlítottuk össze a VSD aktivációt és pórusnyitást leíró feszültségfüggő egyensúlyi és kinetikai paramétereket kontroll sejtekben, valamint szterolokkal történő kezeléseket után. A szterol hatások specificitásának vizsgálatához a koleszterin által kiváltott változásokat összehasonlítottuk a 7-dehidrokoleszterin (7DHC) kezelés esetén megfigyeltekkel. Utóbbi vegyületet a koleszterinhez képest megfigyelhető kismértékű szerkezetbeli eltérése és a Smith-Lemli-Opitz-szindrómában leírt patofiziológiai jelentősége miatt választottuk. A kísérletekkel közelebb kerülhetünk a koleszterin hatásmechanizmusának megértéséhez, ami számos olyan betegség molekuláris alapjainak a megértését segíthetné elő, amelyek a sejtmembrán koleszterintartalmának megváltozásával járnak együtt (pl. hiperkoleszterinémia, SLO-szindróma, Niemann-Pick betegség, Gaucher-kór) ^{85,87-89 85,87-89,181-184}.

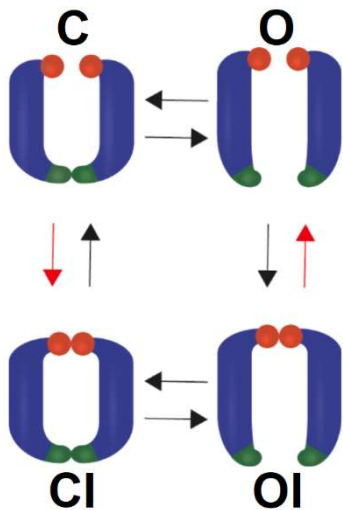


4. ábra Első célkitűzés

A disszertációban megfogalmazott első célkitűzésünk a koleszterin K_v ioncsatornákon belüli elsődleges támadáspontjának meghatározása volt. Ehhez egy új módszert, a kételektrodás voltage-clamp fluorimetriás technikát (TEVCF) alkalmaztuk. Az ábra a $K_v10.1$ ioncsatorna egy alegységének felépítését mutatja oldalnézetből. A számok a hélixeket jelölik, a VSD (lila, azon belül az S4 sárga), illetve a PD (kék) színek az 1-es ábrához hasonló. A barna szín a $K_v10.1$ PAS (Per-Arnt-Sim) doménjét, a narancssárga a C-linkerét, a piros pedig a C-terminálisan található intracelluláris doménjét jelöli (lásd később a 4.3 és 5.1 fejezetek). Az ábrán továbbá jelöltük az S4-S5 linkert, ami a $K_v1.3$ ioncsatorna VSD-PD csatolása szempontjából fontos, $K_v10.$ esetén a két domén közti csatolás bonyolult interhelikális kölcsönhatások révén valósul meg. A TEVCF módszer lényege, hogy miután a VSD S3-S4-es linkerében, extracellulárisan (rózsaszín gömb, L322-es pozíció $K_v10.1$ esetén) létrehozunk egy cisztein pontmutációt, a mérések előtt a ciszteint egy rá specifikus, esetünkben MTS-TAMRA fluoreszcens festékkel megjelöljük. Ahogy az S4-es hélix a depolarizáció során a membrán síkjából elmozdul (fekete nyíl), megváltozik a festék kvantumhatásfoka, így a fluoreszcencia intenzitásának változása értékes információt hordoz számunkra a VSD mozgásával kapcsolatban. Emellett a PD működéséről az egyidejű ionárammérések révén kapunk információt. Ezáltal a módszerrel tehát a PD és a VSD kapuzás során bekövetkező változásai is nyomonkövethetők, ami nélkülözhetetlen a koleszterin ioncsatornán belüli támadáspontjának azonosításához.

A 2. célkitűzési pontban megfogalmazott kérdések középpontjában az áll, hogy milyen szerepet tölt be az aktivációs kapu az egyensúlyi inaktiváció és az inaktivációból történő visszatérés során. Mindkét folyamat negatív membránpotenciálok mellett zajlik le. Az ezekben potenciálisan részt vevő kapuzási átmenetek ($C \rightarrow CI$ ill. $O \rightarrow OI \rightarrow CI \rightarrow C$) negatív potenciálok melletti vizsgálatát több tényező is hátráltatja. Az egyik, hogy ilyen membránpotenciálok mellett a csatornák nyitási valószínűsége kicsi, aminek eredményeképpen a létrejövő áramok kis amplitúdóval rendelkeznek. Emellett a K^+ számára a hajtóerő is kicsi, amely szintén a kis áramok kialakulását segíti elő, ezáltal az aktivációs kapu állapotának árammérések segítségével történő meghatározása során a mérések hibája nagyon nagy. Ezeken felül az átmenetek egy része nemvezető állapotok között történik, így a kapuk állapota árammérések alapján nem feltérképezhető. Ezekre a problémákra ad megoldást számunkra az állapotfüggő cisztein modifikációs módszer¹⁸⁵, aminek segítségével az aktivációs kapu mozgásai pontosan

nyomonkövethetővé és adott állapotban rögzíthetővé válnak negatív membránpotenciálok mellett is. Az aktivációs kapu állapotát az egyensúlyi inaktiváció kialakulása során HEK-293 humán embrionális vesesejtekben kifejezett T449A/V474C *Shaker*-IR csatornában vizsgáltuk, inside-out patch konfigurációban, állapotfüggő cisztein modifikációs esszé segítségével, gyorsperfúziós rendszert alkalmazva. A 474-es pozícióban levő cisztein csak nyitott aktivációs kapu mellett hozzáférhető az intracellulárisan alkalmazott Cd^{2+} számára^{58,185,186}, ami bekötődve gátolja a pozitív tesztpotenciálokra jól mérhető ionáramot. Emiatt az aktivációs kapu negatív membránpotenciálon bekövetkező nyitása is tetten érhető. A nyitott állapotban rögzített aktivációs kapu mellett bekövetkező inaktivációból való visszatérés lehetőségét (vagyis alternatívaként a direkt OI→O átmenet lehetőségét) negatív membránpotenciálok esetén T449A/V476C *Shaker*-IR csatornában vizsgáltuk. A Cd^{2+} keresztkötést hoz létre az egyik alegységen levő cisztein, valamint a szomszédos alegységen levő natív hisztidin között^{23,187}, így az aktivációs kapu mindvégig nyitott állapotban rögzíthető az inaktivációból történő visszatérés lehetőségének vizsgálata során. A Cd^{2+} és a ciszteinek között létrejövő kölcsönhatás specifikussága, valamint a Cd^{2+} -ot tartalmazó oldatok állapotfüggő és precíz alkalmazása a gyorsperfúziós rendszer segítségével az általunk megtervezett pulzusprotokollok mellett biztosították számunkra, hogy a patch-clamp technika segítségével a fent részletezett kapuzási átmeneteket negatív membránpotenciálok mellett is tanulmányozni tudjuk. A negatív membránpotenciálok melletti kapuzási átmenetek vizsgálatának az ad relevanciát, hogy mind az egyensúlyi inaktiváció, mind pedig az inaktivációból történő visszatérés jelentősen meghatározza a potenciálisan aktiválható csatornák számát, ami a sejtek ingerelhetőségének egyik meghatározó tényezője.



5. ábra Második célkitűzés

A disszertációban megfogalmazott második célkitűzésünk annak vizsgálata volt, hogy az aktivációs kapu állapota meghatározza-e az egyensúlyi inaktiváció kialakulását és az inaktivációból történő visszatérést. Ez egyidejűleg annak meghatározását is jelentette, hogy létezik-e a $C \rightarrow CI$ átmenet az egyensúlyi inaktiváció során, illetve elképzelhető-e az $OI \rightarrow O$ kapuzási átmenet az inaktivációból történő visszatérés során negatív membránpotenciálon, *Shaker*-IR csatornában. A $C \rightarrow CI$ átmenet lehetőségének vizsgálata során az aktivációs kapu esetleges nyitását a 474-es pozícióba bevitt cisztein Cd^{2+} általi módosíthatósága alapján határoztuk meg, míg az $OI \rightarrow O$ átmenet lehetőségének tanulmányozásához a 476-os pozícióban ciszteint tartalmazó *Shaker*-IR csatornát használtuk, amelynek aktivációs kapuja nyitott állapotban rögzíthető Cd^{2+} által.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Molekuláris biológia

Az S3-S4 linkerben cisztein mutációkat tartalmazó humán $K_V1.3$ (KCNA3, Uniprot B2RA23) csatornákat pontmutáció segítségével állítottuk elő a vad típusú csatornát tartalmazó pBSTA vektorban (QuikChange; Agilent, Santa Clara, CA, USA). A pontmutáció sikerességét szekvenálással igazoltuk. A pSGEM vektorban található humán $K_V10.1$ (KCNH1, Isoform 1, Uniprot O95259-2) L322C mutáns csatorna L. A. Pardotól származik (Max Planck Institute, Göttingen, Németország). A plazmidokat HindIII ($K_V1.3$) vagy NheI ($K_V10.1$) enzimmel linearizáltuk, majd átírtuk mRNS-sé Invitrogen mMESSAGING mMACHINE T7 Transcription Kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) segítségével.

A mikroszkópos méréseknél használt humán $K_V1.3_{FLAG}$ ioncsatornát kódoló plazmidot Dr. Hajdú Péter (Debreceni Egyetem, Magyarország) állította elő, míg a $K_V10.1_{FLAG}$ ioncsatornát kódoló pCMV6 plazmidot az OriGene-től vásároltuk (referencia szám: RC215104). A GFP-GPI („green fluorescent protein- glycosylphosphatidylinositol” zöld fluoreszcens protein-glükozilfoszfatidilinozitol) plazmid Jennifer Lippincott-Schwartz (NIH, Bethesda, MD, USA) ajándéka volt. A $K_V1.3_{FLAG}$ és $K_V10.1_{FLAG}$ csatornák a FLAG epitóp beépítésen kívül más mutációt nem tartalmaztak.

A disszertációban bemutatott, a C-típusú inaktiváció természetére vonatkozó kísérletek alapjául szolgáló *Shaker*-IR konstruktban (a *Shaker*-IR ioncsatorna GW1-CMV plazmidban R. Horn ajándéka, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) a 6-46 aminosavak hiánya miatt nincs N-típusú inaktiváció, a C301S és C308S pontmutációk pedig kivédtek a Cd^{2+} és az endogén ciszteinek közötti kölcsönhatás zavaró hatását^{188 189}. A konstruktban a *Shaker* B számozás szerinti 449-es (T449A) és 474-es (V474C) vagy 476-os (V476C) pozícióban létrehozott aminosavcseréket QuikChange célzott mutagenézissel (Stratagene, San Diego, CA, USA) állítottuk elő, végül szekvenálással ellenőriztük a mutációk sikerességét.

3.2 Expressziós rendszerek, transzfekció és mRNS injektálás

A kételektródás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) kísérletekhez a *Xenopus laevis* afrikai karmosbéka oocitákat az EcoCyte Bioscience-től (Dortmund, Németország) vásároltuk. A sejteket 30-50 nl mennyiségű, ~1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ koncentrációjú mRNS-sel injektáltuk, majd 1-3 napig 18°C-on inkubáltuk 93 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 1,8 mM CaCl_2 -ot, 1 mM MgCl_2 -ot, 5 mM

HEPES-t és 50 mg/l gentamycint tartalmazó ND93 oldatban (pH=7,4). A dolgozatban szereplő összes oldat előállításához szükséges anyagot a Sigma-Aldrich-tól (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) szereztük be.

A humán embrionális vesesejteket (HEK-293) az American Type Culture Collection-tól (ATCC, Manassas, VA, USA) vásároltuk és a gyártó utasításainak megfelelően tenyésztettük. Az EGFP („enhanced green fluorescent protein” javított fluoreszcenciájú zöld fluoreszcens protein) plazmid és a mutáns *Shaker* konstruktok 1 µg : 10 µg arányú ko-transzfekeciójához kalcium-foszfát alapú transzfekeciós kitet (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) használtunk. A transzfekektált sejteket 35 mm átmérőjű poliszitirénből készült Corning tenyésztő edényekbe helyeztük, amelyet a sejtek inside-out patch-ek létrehozásához szükséges jobb adhéziója érdekében poli-L-ornitinnel (Sigma-Aldrich) előkezeltünk. A transzfekeció után a sejtekben a csatornákat 12-36 óráig expresszáltattuk. Az EGFP pozitív transzfekektált sejteket Nikon TE2000U fluoreszcenciás mikroszkóppal (Nikon, Tokió, Japán) azonosítottuk 455-495 nm-es áteresztésű gerjesztési és 515-555 nm között áteresztő emissziós sávszűrők alkalmazásával. Általánosságban az EGFP pozitív sejtek több, mint 60%-a fejezte ki a ko-transzfekektált *Shaker*-IR csatornákat.

A mikroszkópos mérésekhez a 8-lyukú fedőlemez aljú kamrákban növesztett HEK-293 sejteket 0,25 µg DNA/lyuk koncentrációban alkalmazott $K_v1.3_{FLAG}$, $K_v10.1_{FLAG}$, vagy GPI-horgonnyal ellátott zöld fluoreszcens protein (GFP-GPI) fehérjét kódoló plazmiddal transzfekektáltuk Lipofectamine2000 (ThermoFisher) reagenssel, 2:1 (µl/µg) lipid:DNS arány használatával. A csatornákat transzfekeció után 12-36 óráig expresszáltattuk.

3.3 A sejtmembrán szterol tartalmának módosítása

A sejtmembrán szterol tartalmának módosítása koleszterin (Sigma-Aldrich), 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)metil]amino]-27-norkoleszterin (NBD-koleszterin, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) vagy 7-dehidrokoleszterin (7DHC) (Sigma-Aldrich) vegyületek metil-béta-ciklodextrinnel (MβCD) képzett komplexei (CycloLab Cyclodextrin R&D Laboratory, Budapest, Magyarország) segítségével történt. A szterol-MβCD komplexek töltéshez használt koncentrációit úgy határoztuk meg, hogy azok 195 µM szterolt tartalmazzanak. A koleszterin-MβCD komplexszel történő kezelésünk nagyobb, de a hiperkoleszterinémias betegekben mérhetővel azonos nagyságrendű koleszterinszintbeli emelkedést okozott¹⁹⁰. Ehhez hasonlóan, az SLO- szindrómában szenvedő betegek esetén a 7DHC dúsulása összemérhető az *in vitro* 7DHC-MβCD komplexszel történő töltés során

tapasztalhatókkal^{146,191}. Ezek révén modellünk patofiziológiai szempontból relevánsnak tekinthető. Az elektrofiziológiai vagy mikroszkópos kísérletek előtt a komplexekkel 60 percen keresztül kezeltük szobahőmérsékleten mind az oocitákat, mind a HEK-293 sejteket. Elektrofiziológiai mérésekhez a szterol-M β CD komplexeket ND93-ban, míg mikroszkópiához 150 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 1,5 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot és 10 mM HEPES-t tartalmazó 7,36-7,38 közötti pH-jú oldatban oldottuk fel. Mindkét esetben inkubáció után az oocitákat, illetve HEK-293 sejteket alaposan mostuk a komplexektől mentes oldatokkal.

3.4 Elektrofiziológia

3.4.1 Kételektródás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF)

Kételektródás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) mérésekhez az oocitákat jégen 30 percen keresztül jelöltük 10 μ M 2-((5(6)-tetrametilrhodamin)karboxilamino)etil metántioszulfonátot (TAMRA-MTS, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada) tartalmazó depolarizáló oldatban (110 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM CaCl₂, 0,2 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7,1). Jelölés után az oocitákat alaposan mostuk ND93 oldattal, majd sötétben és jégen tartottuk a mérések megkezdéséig. A mérésekhez ND93-at használtunk extracelluláris oldatként, míg az intracelluláris oldat 3 M KCl oldat volt. A mérésekhez használt pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegkapillárisokból (Harvard Apparatus Kent, Egyesült Királyság) húztuk és ellenállásuk 2–3 M Ω volt.

A TEVCF során az oocita membránpotenciál beállítását és az ionáramok mérését Oocyte Clamp OC-725C erősítővel (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) végeztük. A fluoreszcens jel intenzitását Nikon Eclipse FNI mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán), 40 \times , 0,8-NA CFI Plan Fluor Nikon víz immerziós objektív és fotodióda (PIN-040A; United Detector Technology, OSI Optoelectronics, Hawthorne, CA, USA) segítségével mértük. A TAMRA-MTS jelének detektálásához 545/25 gerjesztési szűrőt, 565LP dikroikus tükröt és 605/70 emissziós szűrőt használtunk. A fotodióda jelét Axopatch 200A erősítővel amplifikáltuk, és az ionáramokkal együtt az adatokat pClamp10 programcsomag (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) által vezérelt Axon Digidata 1550 (Molecular Devices) illesztőegységgel digitalizáltuk. A megvilágításhoz M530L2-C1 zöld (530 nm-es) LED-et (ThorLabs, Newton, NJ, USA) használtunk. A TEVCF mérések során az ionáramok és fluoreszcens jelek mérése esetén a mintavételezés 5 kHz frekvenciával történt. Az ábrákon a fluoreszcencia görbék egyedi mérések során nyert Gauss-szűrővel filterezett átlagolás nélküli adatokat mutatnak. Az online

szűrőzés a mintavételezési frekvencia felénél kisebb frekvenciaértékkal történt, jellemzően a mintavételezés: szűrőzés aránya 2:1 volt. A fluoreszcens jelek analízise során további offline szűrőzést alkalmaztunk.

3.4.2 Patch-clamp mérések outside-out konfigurációban

Az egyedi csatorna paramétereiket mechanikusan devitellinizált oociták outside-out konfigurációban történő patch-clamp méréseivel határoztuk meg. A 7,36-7,38 közötti pH értékre beállított standard intracelluláris oldat 105 mM KF-ot, 35 mM KCl-ot, 10 mM EGTA-t és 10 mM HEPES-t tartalmazott. A 7,36-7,38 közötti pH értékre beállított standard extracelluláris oldat 150 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 1,5 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot és 10 mM HEPES-t tartalmazott. A mérésekhez használt pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegapillárisokból (Harvard Apparatus, Kent, Egyesült Királyság) húztuk és ellenállásuk 8–9 MΩ volt. A mérések során Axopatch 200B és Multiclamp 700B erősítőket használtunk és az adatokat Axon Digidata 1550 segítségével digitalizáltuk.

3.4.3 Patch-clamp mérések inside-out konfigurációban

Az adatgyűjtéshez Axopatch 200B erősítőt (Molecular Devices) használtunk, az adatok digitalizálása Axon Digidata 1550 (Molecular Devices) illesztőegységgel történt. A mérés során a mintavételezés frekvenciája a szűrők sarkfrekvenciájának legalább kétszerese volt. A mérésekhez használt pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegapillárisokból (Harvard Apparatus) húztuk és ellenállásuk 8–9 MΩ volt. A mérések során csak azon patch-ek adatait vettük figyelembe, amelyek esetén az aspecifikus szivárgó áram nagysága a csúcsáram kevesebb, mint 5%-a volt. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (20–24°C) végeztük. A könnyebb érthetőség kedvéért az inside-out mérések során nyert K⁺ áramok irányát, valamint a feszültségprotokollokat a dolgozatban mindvégig az általános konvencióknak megfelelően tüntettük fel, tehát a pozitív töltéshordozó sejtől kifelé irányuló áramát pozitív áramjelként ábrázoltuk.

Az inside-out méréseknél használt intracelluláris oldat 105 mM KF-ot, 35 mM KCl-ot, 10 mM EGTA-t és 10 mM HEPES-t tartalmazott. Az oldat pH-ját KOH-dal titráltuk 7,36-7,38-as értékre, így végül az összesített K⁺-koncentráció 160–165 mM-nak, az ozmolaritás pedig 285–295 mOsm/L-nek adódott. A perfúziós rendszer kinetikájának karakterizálása során használt belső oldat hasonló összetételű volt, annyi különbséggel, hogy az 50 mM K⁺-ot tartalmazott és a megfelelő káliumsókat 100 mM NaF-dal helyettesítettük. A Cd²⁺-modifikációs

kísérletekhez az intracelluláris oldat a standard K^+ -bázisú oldathoz hasonló volt, azzal a módosítással, hogy 125 mM KF, 35 mM KCl és 10 mM HEPES mellett EGTA-t nem tartalmazott. A standard extracelluláris (az inside-out konfiguráció miatt a pipettában levő) oldat 150 mM NaCl-ot, 2 mM KCl-ot, 1,5 mM $CaCl_2$ -ot, 1 mM $MgCl_2$ -ot és 10 mM HEPES-t tartalmazott, ozmolaritása 290 mOsm/L, pH-ja 7,36-7,38 volt.

A mérések során a gyors oldatcseréhez egy három kimenettel rendelkező perfúziós fejrel ellátott Warner Instruments SF-77A Perfusion Fast-Step perfúziós rendszert használtunk. A mikroperfúzió kimenetein folyamatos volt a folyadékok áramlása, a precíziós motor az adatgyűjtéssel szinkronizálva pozicionálta a megfelelő kimenetet az inside-out patch intracelluláris felszínével szemben. Az inside-out patch-eket 0,5 ml/perc áramlási sebességgel perfundáltuk a megfelelő intracelluláris oldatokkal. Az oldatcsere sebességének meghatározásához használt tesztprotokoll elvét és módját már korábban leírták^{58,186}. Az oldatcsere teljes mértékben végbement 30 ms alatt.

3.5 Konfokális lézer pásztázó és stimulált emisszió depléció (STED) mikroszkópia

A mikroszkópos analízis során a HEK-293 sejteken kétféle módszerrel jelöltük a lipidtutajokat a korábban leírtak szerint¹⁹². Egyrészt a GM1-gangliozidban gazdag membrán mikrodoméneket 8 μ g/ml AlexaFluor647 fluorofórral konjugált koleratoxin B alegységgel (CTX-B) (ThermoFisher) jelöltük 20 percig jégen, hogy a CTX-B internalizációját elkerüljük. Másrészt a GFP-GPI-t tartalmazó lipidtutajok jelöléséhez a sejteket GFP-GPI-t kódoló plazmiddal transzfektáltuk.

Az ioncsatornák jelöléséhez $K_v1.3_{FLAG}$ vagy $K_v10.1_{FLAG}$ fehérjéket expresszáló sejteket inkubáltunk 2 μ g/ml anti-FLAG M2-Cy3 antitest (Sigma-Aldrich) jelenlétében 30 percig jégen. Mivel $K_v10.1$ esetén a FLAG epitóp a fehérje intracelluláris részén helyezkedik el, a sejteket előbb 3,7%-os formaldehidben fixáltuk, majd a jelölés 0,1% BSA-t és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben történt.

A szterolokkal kezelt vagy kontroll minták jelölése után a sejtek fedőlemezhez tapadó lapos membránrégióiról készítettünk felvételeket LSM880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) segítségével. Az NBD, GFP, Cy3 és AlexaFluor647 fluorofórokat rendre 458 nm-en, 488 nm-en, 543 nm-en és 633 nm-en gerjesztettük és az emittált fluoreszcencia intenzitásokat rendre a 482-696 nm, 493-598 nm, 548-629 nm, és 638-756 nm hullámhossz-tartományokban detektáltuk.

Stimulált emisszió depléció (STED) mikroszkópos méréseink során Kv1.3_{FLAG} fehérjét kifejező sejteket 2 µg/ml anti-FLAG M2 antitesttel jelöltünk (Sigma-Aldrich) 30 percig szobahőn, amelyet 8 µg/ml AlexaFluor594-CTX-B (ThermoFisher) és StarRed-GAMIG (Abberior, Göttingen, Németország) jelenlétében jégen történő 30 perces inkubáció követett. STED modulussal (Abberior) ellátott Olympus BX53 mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó lapos régióiról Olympus 100x/1.4 objektív segítségével 594 és 640 nm-es gerjesztést és 775 nm-es STED nyalábot alkalmazva. Az AlexaFluor594 és StarRed esetén a detektálás rendre a 608-627 nm és 650-700 nm tartományokban történt.

3.6 Adatok elemzése

3.6.1 Kételektrodás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) mérések elemzése

Az elektrofiziológiai mérések során nyert adatok elemzését minden esetben Clampfit (v10; Molecular Devices), SigmaPlot (v10; Systat Software, San Jose, CA, USA) és Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) programokkal végeztük.

A TEVCF mérések során az ionáramok és fluoreszcens jelek mérése esetén a mintavételezés 5 kHz frekvenciával történt. A fluoreszcens jelek nagyságát a $\Delta F/F$ százalékos arányában fejeztük ki, ahol ΔF a jel amplitúdójának változását, míg F a tartófeszültségen az alap fluoreszcencia szintjét jelöli. A fotoelhalványítás okozta hatások korrekciójához a különböző membránpotenciálokon nyert fluoreszcencia adatokból kivontuk a -100 mV-os tesztfeszültséghez tartozó fluoreszcens jelet. A Kv1.3 309C $F_{\text{norm}}-V$ értékeinek meghatározásához a fluoreszcens jelek egyensúlyi komponenseit normáltuk a maximális intenzitásra és a kapott értékeket a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk. Az MTS-TAMRA fluorofórral jelölt Kv10.1 322C a Kv1.3 ionszatornával ellentétben komplex fluoreszcens jelet adott, amely felbontható hiperpolarizált (-180 és -90 mV közötti) és depolarizált (-80 és $+60$ mV közötti) membránpotenciál mellett mért komponensekre. A hiperpolarizált membránpotenciálok mellett mért jeleknek két azonos polaritású komponense volt (**10A ábra** lila színű fluoreszcens jel, **11D** betét ábra), így azokat a Kv1.3 jeleihez hasonló módon elemeztük. Ezzel szemben a depolarizált membránpotenciál mellett mért jeleknek két ellentétes polaritású komponense volt (**10A ábra** világoskék színű fluoreszcens jel, **11D** betét ábra). A jel abszolút értékének meghatározásához a második komponens ellentétes polaritással hozzáadtuk az első komponenshez.

Az I-V görbék meghatározásához a szivárgó árammal korrigált csúcsáramokat a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk. A K_V1.3 309C és K_V10.1 322C konduktancia-feszültség (G-V) görbéit jellemző V_{1/2} és k paramétereinek meghatározásához a feszültség-áramerősség (I-V) görbékhez az

$$I = V \times G_{max} \times \frac{(1 - e^{-(V-E_{ekv})/25})}{(1 - e^{-V/25})} \times \frac{1}{1 + e^{-(V-V_{1/2})/k}} \quad (3.6.1.1)$$

egyenletet illesztettük, amely a Goldman-Hodgkin-Katz rektifikációt kombinálja a Boltzmann-függvény által leírt feszültségfüggéssel. Itt V a feszültséget, míg I az áramerősséget jelöli és a függvény szabad paramétere a maximális konduktancia (G_{max}), az egyensúlyi potenciál (E_{ekv}), valamint a Boltzmann-függvény félaktivációs feszültsége (V_{1/2}) és meredekségi együtthatója (k). A 25-ös szám a Goldman-Hodgkin-Katz egyenletből az egyetemes gázállandó és abszolút hőmérséklet szorzatának, illetve az ion töltésének és a Faraday-állandó szorzatának hányadosa mV-ban mérve. Ezután az adott tesztpotenciálok esetén a normált G értékeket minden sejt esetén a

$$G(V) = \frac{1}{1 + e^{-(V-V_{1/2})/k}} \quad (3.6.1.2)$$

függvény alapján számítottuk, ahol G(V) az adott tesztpotenciálon számított konduktanciát, V az aktuális membránpotenciált, V_{1/2} a félaktivációs feszültséget, k pedig a meredekségi együtthatót jelölik. A G meghatározása az oocitában történő mérések esetén azért történt másképp, mint a hagyományos patch-clamp mérések esetén, mivel az oocitákban méretüknél fogva nem ismerjük adott belső oldat alkalmazása mellett az intracelluláris káliumkoncentrációt, így az egyensúlyi potenciál értékét sem.

Az ionáramok aktivációs időállandóinak meghatározásához az áramgörbék emelkedő szakaszára egykomponensű, elsőfokú, telítésbe futó exponenciálisan emelkedő függvényt illesztettünk:

$$I(t) = I_0 \times (1 - e^{-t/\tau_{act}}) + C \quad (3.6.1.3)$$

ahol I(t) az áramamplitúdó az adott t időpillanatban, I₀ a maximális áramamplitúdó, τ_{act} az aktivációs időállandó, C pedig egy konstans, nem időfüggő áramkomponens.

A fluoreszcens jelek esetén a gyors (τ_f) és lassú (τ_s) időállandók meghatározásához kétkomponensű, telítésbe futó, exponenciálisan emelkedő függvényt alkalmaztunk:

$$F(t) = F_{0f} \times (1 - e^{-t/\tau_f}) + F_{0s} \times (1 - e^{-t/\tau_s}) + C \quad (3.6.1.4)$$

ahol $F(t)$ a t időpillanatban mért fluoreszcencia intenzitás, F_{0f} a fluoreszcens jel gyors komponensének amplitúdója, τ_f a fluoreszcens jel gyors komponensének időállandója, F_{0s} a fluoreszcens jel lassú komponensének amplitúdója, τ_s a fluoreszcens jel lassú komponensének időállandója, C pedig a nem időfüggő fluoreszcencia intenzitás.

Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését jellemző görbék (SSI) meghatározásához minden feszültségen kiszámítottuk a nem inaktiválódó csatornák hányadát I/I_{-120} szerint, ahol I a különböző tartófeszültségekről történő +50 mV-os depolarizáció által kiváltott csúcsáram, míg I_{-120} a -120 mV-os tartófeszültségről történő depolarizáció során kiváltott csúcsáram nagysága.

A különböző egyensúlyi paramétereket leíró összefüggések ($F_{\text{norm-V}}$, SSI) kvantifikálásához az adatpontokra Boltzmann-függvényt illesztettünk, ami alapján meghatároztuk a félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$) és a meredekségi együttható (k) értékeit:

$$y = \frac{1}{1 + e^{-(V-V_{1/2})/k}} \quad (3.6.1.5)$$

A függvényben y a normált fluoreszcencia intenzitás ($F_{\text{norm-V}}$ esetén) vagy a normált áram amplitúdó (SSI esetén), V az aktuális membránpotenciált, $V_{1/2}$ a félaktivációs feszültséget, k a meredekségi együtthatót jelöli.

A $K_V10.1$ csatornák Cole-Moore shiftjének vizsgálatához 10 s hosszúságú -160 és -60 mV közötti tartományban változtatott tartófeszültségről +40 mV-ra depolarizáltuk a sejteket 500 ms-ig. Az ionáramok aktivációs időállandóinak meghatározásához elsőfokú exponenciális függvényt illesztettünk a különböző pulzus előtti potenciálok alkalmazása esetén kiváltott áramok esetén kapott adatokra. Az illesztés során nem vettük figyelembe az áramok első szigmoid fázisát.

A TEVCF mérések során a szterolokkal történő töltések által okozott áramcsökkenés meghatározásához a $K_V1.3$ esetén +40 mV-os, $K_V10.1$ esetén +60 mV-os depolarizáló pulzusok által kiváltott csúcsáramok adatait átlagoltuk az adott napon mért kontroll, koleszterinnel, illetve 7DHC-val kezelt oociták esetén, majd a számított értékeket normáltuk az adott napon mért kontroll sejtek csúcsáramainak átlagára. Ezáltal minden mérési napon számítottunk egy

normált áramamplitúdót, a bemutatott SEM adatok pedig a normált amplitúdók napi variabilitásából származnak.

3.6.2 Outside-out konfigurációban történő patch-clamp mérések elemzése

A nem-egyensúlyi zajanalízis során az oocitákból tépett outside-out konfigurációjú patch-eket -100 mV-os tartófeszültségről $+50$ mV-ra depolarizáltuk 200 ms hosszúságú pulzusokkal egymás után 200 alkalommal 2 másodpercenként. Az elemzés során nem vettük figyelembe azokat az áramgörbéket, amelyeknél a mérés végére az áramok nagysága jelentősen lecsökkent az átlagos értékhez viszonyítva. Az így kapott áramgörbe teljes hosszában meghatároztuk az egyes időpillanatokhoz tartozó áram átlagos értékeit ($\langle I \rangle$), valamint annak varianciáját (σ_I^2). A σ_I^2 értékét az $\langle I \rangle$ függvényében ábrázoltuk, amely egy parabolát eredményezett az

$$\sigma_I^2 = i \langle I \rangle - (\langle I \rangle^2 / N) \quad (3.6.2.1)$$

egyenlet alapján, ahol i az egyedi csatornán átfolyó áram és N az adott membrándarabban található csatornák száma ¹⁹³. Az egyedi csatornákon átfolyó áram nagyságát a parabola gyökeinél számított első deriváltból határoztuk meg, míg az egyedi csatornák konduktanciáját $i / (V - E_{ekv})$ alapján számoltuk, ahol V az alkalmazott tesztpotenciál, E_{ekv} pedig a K^+ áram egyensúlyi potenciáljának nagysága. A nyitási valószínűséget az $\langle I \rangle$ maximális értékének és a másodfokú függvény gyökének hányadosaként számítottuk, ahol iN az $\langle I \rangle$ elméleti maximum értéke, amennyiben $P_o = 1$.

3.6.3 Inside-out konfigurációban történő patch-clamp mérések elemzése

Kiértékelés előtt az inside-out áramgörbéket minden esetben digitálisan szűrőztük hárompontos boxcar filterrel. Az elemzés előtt minden, a konduktancia-feszültség ($G-V$) és az SSI görbék előállításához felhasznált ionáramot korrigáltunk az ohmikus szivárgási áramra.

A mutáns *Shaker*-IR csatornák $G_{norm}-V$ görbéinek meghatározásához az inside-out patch-eket -120 mV-os tartófeszültségről depolarizáltuk -100 és $+70$ mV közötti teszt-feszültségekre 10 mV-os léptékkal 100 ms hosszan 60 s-onként. Az adott tesztpotenciálok (V) esetén a konduktancia értékeket a szivárgási árammal korrigált csúcsáramok (I_{peak}) és a K^+ egyensúlyi potenciálja (E_{ekv}) segítségével határoztuk meg a $G = I_{peak} / (V - E_{ekv})$ képlet alapján.

Bár nem-inaktiválódó áramok esetén a G-V görbe meghatározásához az általános módszer az izokronális farokáram analízise, az általunk alkalmazott *Shaker-IR/T449A* csatornák inaktiválódnak, ami a farokáram analízisének értelmezését megbonyolítja, ezért nem ezt a módszert alkalmaztuk. Az adott G értékeket a maximális konduktancia nagyságára normáltuk (G_{norm}) és a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk. A G_{norm} -V görbéket Boltzmann-függvény illesztésével kvantifikáltuk:

$$y = \frac{1}{1 + e^{-(V-V_{1/2})/k}} \quad (3.6.3.1)$$

ahol y a normált konduktancia értéke adott membránpotenciál mellett (V). Az illesztett függvény segítségével határoztuk meg a félaktivációs feszültséget ($V_{1/2}$) és a meredekségi együtthatót (k).

Az áramok inaktivációs időállandójának (τ_{inact}) meghatározásához 2000 ms hosszúságú +50 mV-os depolarizáló pulzusokat alkalmaztunk. Az áramgörbék csökkenő szakaszára a csúcáram 90%-ának megfelelő értéktől kezdődően elsőfokú egykomponensű exponenciálisan csökkenő függvényt illesztettünk:

$$I = I_0 \times e^{-t/\tau_{\text{inact}}} + C \quad (3.6.3.2)$$

ahol I az aktuális áramamplitúdó, C az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága, I_0 az inaktiválódó komponens amplitúdója, t az illesztés kezdetétől számított idő, τ_{inact} pedig az inaktivációs időállandó.

Az áramok aktivációs időállandójának (τ_{act}) kiszámításához -120 mV-os tartófeszültségről kiinduló 5 ms hosszúságú +50 mV-os depolarizáló pulzust használtunk, majd a kiváltott áramok görbéjét a Hodgkin-Huxley n^4 -modell szerint illesztettük:

$$I = I_0 \times (1 - e^{t/\tau_{\text{act}}})^4 + C \quad (3.6.3.3)$$

A függvényben I az aktuális áramerősséget, I_0 a maximális áramamplitúdó, τ_{act} az aktivációs időállandót, t az illesztés kezdetétől számított időt, C az egyensúlyi (steady-state) áram nagyságát jelöli.

Az inaktivációból való visszatérés kinetikájának méréséhez -120 mV-os tartófeszültségről kiinduló párban alkalmazott, ioncsatorna konstruktól függően 200, illetve

400 ms hosszúságú +50 mV-os pulzusokat használtunk. A pulzusok közötti –120 mV-os intervallumok (ipi) időtartamát 0,5 és 60 s között változtattuk. A visszatérési hányadot az

$$\frac{I_2 - I_{SS1}}{I_1 - I_{SS1}} \quad (3.6.3.4)$$

képlet alapján számítottuk, ahol I_2 a második, I_1 az első pulzus által kiváltott csúcsáram, I_{SS1} pedig az első depolarizáció végén mérhető egyensúlyi áram nagyságát jelöli. Az inaktivációból való visszatérés időállandójának (τ_{rec}) számításához az adatpontokra egykomponensű, elsőfokú, telítésbe futó exponenciálisan emelkedő függvényt illesztettünk:

$$I = I_0 \times (1 - e^{-t/\tau_{rec}}) \quad (3.6.3.5)$$

ahol I a t időpontban az áramamplitúdó, I_0 a maximális áram amplitúdója, τ_{rec} pedig az inaktivációból való visszatérés időállandója.

Az egyensúlyi inaktivációt jellemző görbék (SSI) leírásához minden feszültség esetén kiszámítottuk a nem-inaktiválódó csatornák hányadát I/I_{-120} szerint, ahol I az adott pulzus előtti tartófeszültségről, míg I_{-120} a –120 mV-os tartófeszültségről a depolarizáció által kiváltott áram nagyságát jelöli. A $V_{1/2}$ és k értékeit az adatpontokra illesztett Boltzmann-függvény segítségével határoztuk meg.

3.6.4 Konfokális lézer pásztázó és (STED) mikroszkópiás mérések elemzése

HEK-293 sejtek jelölése és konfokális lézerpásztázó vagy STED mikroszkópos képalkotás után az ioncsatornák és a lipidutajok közötti kolokalizáció mértékét a korábban leírtak szerint határoztuk meg¹⁹². Ehhez a lipidutaj marker, az ioncsatornához kötődő antitestek és bizonyos esetekben a fluoreszcensen jelzett koleszterin fluoreszcencia intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens értékét számítottuk ki. A képelemzés során a számításokat a manuálisan egy „sejt maszk” definiálásával kijelölt sejtmembránból származó pixelek adataival végeztük. A Pearson-együttható értékeit egyedi sejtekben határoztuk meg a pixelenkénti intenzitás adatokból egy erre a célra készített Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) algoritmus segítségével. A együttható számítása során elvileg véletlenszerűen is adódhat pozitív érték valós pozitív kolokalizáció hiányában is. Az ilyen nem valós pozitív korreláció lehetőségének kizárását Costes módszere szerint végeztük a korábban leírt módon¹⁹². A

módszer során az adott sejt esetén a két fluorofórról készített felvételeken a pixelenkénti intenzitásokat egy erre a célra készített algoritmus véletlenszerűen összekeveri, majd az így keletkező két új kép pixelenkénti adataiból kiszámítja az intenzitások közötti Pearson-koefficiens nagyságát, amelynek értéke a véletlenszerű keverés és a korreláció ebből fakadó hiánya miatt 0 körül ingadozik. Ezt a folyamatot az algoritmus 100 alkalommal megismétli, majd az így nyert adatokból kiszámítja az együttható 95%-os konfidencia intervallumát, amely statisztikai értelemben a koefficiensnek a korreláció hiányában várható tartományát határozza meg. Amennyiben a valós adatokból számított együttható értéke ezen tartományon kívülre esik, statisztikai értelemben szignifikánsnak tekinthető a fluorofórok jele közötti korreláció. Pozitív kontrollként pedig két ismert és elfogadott lipiddutaj marker között számítottuk ki módszerünkkel a korrelációs koefficiens nagyságát.

3.7 Statisztika

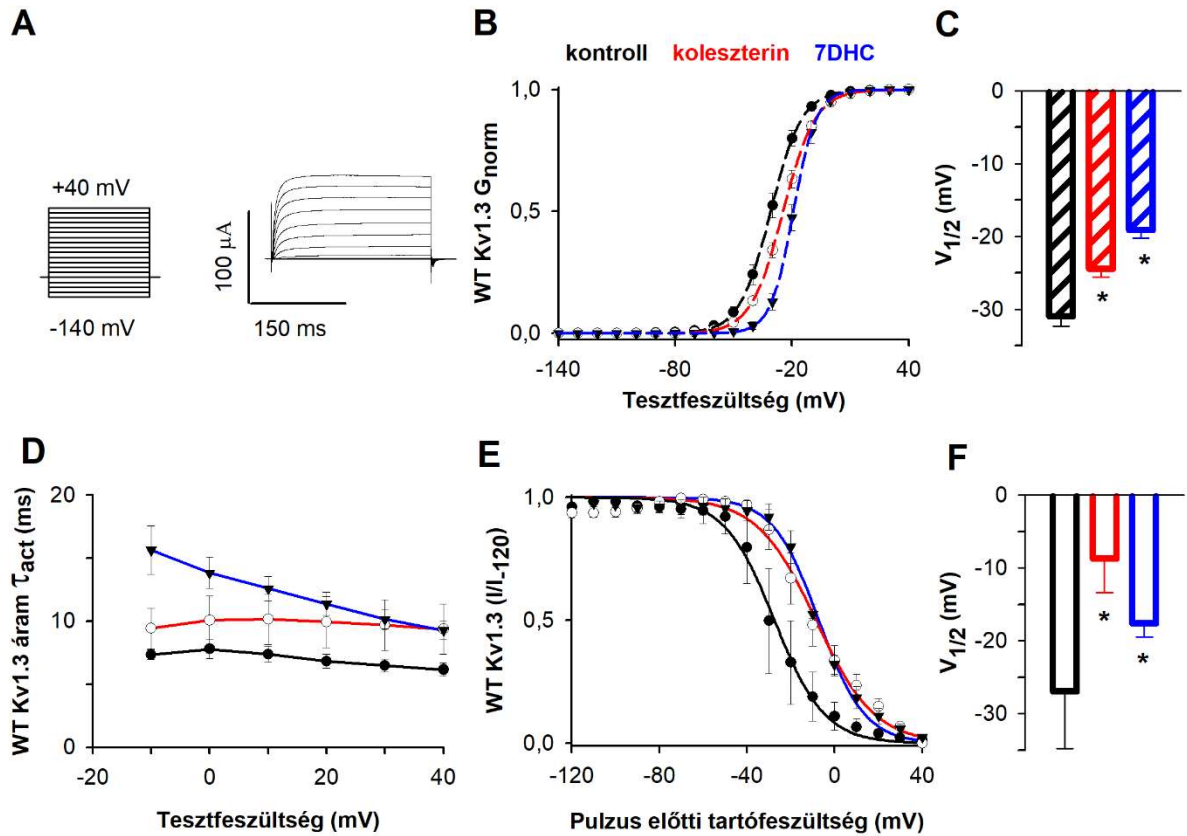
Az elektrofiziológiai mérések során nyert adatok legalább három független transzfekcióból, illetve injektálásból származnak. A mikroszkópos elemzés során legalább három független kísérlet adatait használtuk.

A disszertációban az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk. Az adott elemzés során felhasznált sejt számát (n) a szövegben jelöltük. Az eltérések statisztikai vizsgálata során a p értékeket ANOVA analízist követően Tukey's HSD (honestly significant difference) teszt segítségével számítottuk ki. Az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak (*). A **19C, D ábrákon** a (**) szimbólum a kontrollon kívül minden más mintától szignifikáns mértékben különböző mintákat jelöli ($p < 0,05$).

4. Eredmények

4.1 Szterolok hatása a $K_{V1.3}$ ioncsatorna feszültségfüggő kapuzásának egyensúlyi és kinetikai paramétereire

A $K_{V1.3}$ ioncsatorna szterolok iránti érzékenységének vizsgálata során kapott korábbi eredményeink alapján a sejtmembrán koleszterin vagy 7DHC tartalmának növelése lecsökkenti a teljessejt-áramok nagyságát, a konduktancia feszültségfüggését leíró $G_{\text{norm}}-V$ görbe jobbra tolódását eredményezi, valamint lelassítja a csatorna aktivációs kinetikáját mind humán limfocitákban, mind pedig CHO sejtekben^{144,146}. Kísérleteink kezdetekor a hagyományos emlőssejtes rendszerekben, illetve humán mintákban megfigyelt fenti eltéréseket kíséreltük meg reprodukálni *Xenopus laevis* afrikai karmosbéka oocita expressziós rendszerben kifejezett vad típusú $K_{V1.3}$ csatornákon (**6. ábra**). A **6A ábrán** mutatom be a $K_{V1.3}$ áramok regisztrálására használt feszültségprotokollt és az ionáramokat. Az így nyert ionáramokból származtatott, a normált konduktancia feszültségfüggését ábrázoló grafikonok azt mutatják, hogy a sejtmembrán koleszterinnel és 7DHC-val történő töltése jelentősen módosítja ezt az összefüggést (**6B ábra**). A mérések során nyert adatok statisztikai analízise azt mutatja, hogy a $V_{1/2}$ érték szignifikánsan depolarizált koleszterin és 7DHC töltést követően (**6C ábra**), hasonlóan az emlős sejtekben tapasztaltakhoz. Az áramok aktivációs kinetikáját jellemző időállandókat szintén szignifikánsan megnövelte a sejtmembrán koleszterinnel vagy 7DHC-val történő töltése, azaz ilyen körülmények között az áramok lassabb kinetikával aktiválódtak a kezeletlen (kontroll) oocitákban mértékhez képest. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése szintén depolarizáció irányába tolódott el a sejtmembrán szterollokkal történő töltésének hatására (**6E ábra**), a $V_{1/2}$ értékek kvantitatív analízise szignifikáns különbséget mutat a kontrollhoz képest mind koleszterin, mind pedig 7DHC töltést követően (**6F ábra**). Eredményeink azt mutatják, hogy a membránösszetételbeli eltérések ellenére a *Xenopus* rendszer megfelelően modellezi az emlős sejtekben megfigyelhető ilyen jellegű fehérje-membrán kölcsönhatásokat.



6. ábra A szterol töltések hatása a vad típusú Kv1.3 ionszernára

A koleszterin (üres körök, piros vonal) és 7DHC (fekete háromszög, kék vonal) *Xenopus laevis* oocitákban expresszált vad típusú Kv1.3 (WT Kv1.3) csatornára gyakorolt hatásainak meghatározása során azt vizsgáltuk, hogy a membrán szteroltartalmának növelése hasonló változásokat hoz-e létre a csatorna különböző elektrofiziológiai paramétereiben az általunk alkalmazott oocita expressziós rendszer esetén, mint amelyeket korábban emlős sejtekben tapasztaltak. Az **A** panel a **B,C,D** paneleken feltüntetett adatpontokhoz szükséges mérések során alkalmazott feszültségprotokollt, valamint az ennek hatására kiváltott ionáramokat mutatja. Az ionáramok meghatározásához az oocitákat -100 mV-os feszültségen tartottuk, majd -140 és $+40$ mV közötti tartományban 10 mV-os lépésekben változtatott tesztpotenciálokkal depolarizáltuk 30 s-onként. A depolarizáló pulzus időtartama 250 ms volt. (**B**) A grafikonon ábrázolt szaggatott (G_{norm} -V) vonalak az adatpontokra legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényeket mutatják (3.6.1.2 egyenlet). A **C** panelen a vad típusú Kv1.3 esetén átlagolt $V_{1/2}$ értékeket ábrázoltuk (3.6.1.1 egyenlet alapján). A csíkozott oszlopok a G_{norm} -V görbék $V_{1/2}$ értékeit mutatják. A grafikonokon a minták sorrendje: kontroll (fekete), majd a koleszterinnel (piros), illetve 7DHC-val (kék) kezelt minta. Mindkét szterollal történő töltés hatására az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése ($n=5-9$), szignifikáns mértékben depolarizáció irányába tolódott. (**D**) Az aktivációs időállandók (τ_{act}) meghatározásához elsőfokú exponenciális függvényeket illesztettünk a különböző tesztpotenciálokon mért ionáramokhoz (lásd Anyagok és módszerek 3.6.1.3 egyenlet) és ezek átlagait tüntettük fel kontroll (fekete körök, fekete vonal), koleszterinnel (üres körök, piros vonal) vagy 7DHC-val kezelt sejtek (fekete háromszög, kék vonal) esetén. Az aktivációs időállandók nagysága szignifikáns mértékben megnőtt a kontroll mintákhoz képest ($n=4-5$), ami szintén megegyezik a szterolok emlős sejtekben leírt Kv1.3-ra kifejtett hatásaival. (**E**) Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének vizsgálatára a sejteket -120 mV és $+40$ mV közötti ($\Delta V = 10$ mV) tartományba eső feszültségen tartottuk 20 s-ig, majd egy 100 ms hosszúságú $+40$ mV-os teszt pulzust alkalmaztunk a K^+ áramok kiváltására. A nem inaktiválódó csatornák hányadát minden feszültség esetén az I/I_{-120} képlettel határoztuk meg, ahol I az adott tartófeszültségről a depolarizáció által kiváltott csúcsáram nagysága, míg I_{-120} a -120 mV-os tartófeszültségről történő depolarizáció által kiváltott csúcsáram nagysága. Az egyensúlyi inaktivációkat leíró görbékre Boltzmann-függvényt illesztettünk (lásd Anyagok és Módszerek, 3.6.1.5 egyenlet). (**F**) A szterol töltések hatására az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését jellemző $V_{1/2}$ érték szignifikáns mértékben depolarizáció irányába tolódott ($n=3$). A grafikonokon a minták sorrendje: kontroll (fekete), majd a koleszterinnel (piros), illetve 7DHC-val (kék) kezelt minta. Az eltolódások iránya megegyezik a **B** panelen bemutatott G_{norm} -V görbék eltolódásának irányával.

Ahhoz, hogy a Kv1.3 feszültség-szenzorának mozgásait TEVCF technikával tanulmányozni tudjuk, a fluorofórral történő jelöléshez pontmutáció segítségével egy cisztein aminosavat kellett bevinnünk a csatorna extracellulárisan található S3-S4 linkerébe. Mivel korábban még nem írtak le a TEVCF mérésekhez leginkább megfelelő, cisztein mutációt hordozó Kv1.3 ioncsatornát, a mérésekhez leoptimalisabban használható (nagy amplitúdójú, könnyen elemezhető fluoreszcens jelet adó csatorna, amely konduktanciája és főbb elektrofiziológiai paraméterei nem térnek el a vad típusú csatorna megfelelő paramétereitől) cisztein szubsztitúciós hely megtalálásához az S3-S4 linker aminosavait pontmutációval egyenként ciszteinre cseréltük, majd az így létrehozott mindegyik mutáns csatornát leteszteltük TEVCF-fel (**1. táblázat**). Az S4-es hélix tetejéhez közeli 309-es pozíciójában létrehozott Ala (alanin) → Cys (cisztein) mutáció bizonyult a leginkább alkalmas választásnak a TEVCF mérések számára a konstrukt nagy és feszültségfüggő, egyfázisú fluoreszcens jele miatt.

Kv1.3 S3-S4 linker cisztein mutánsok	A fluoreszcens jel intenzitása		
	AlexaFluor488-maleimid	TMRM-maleimid	MTS-TAMRA
N301C	Alacsony	-	-
G302C	Alacsony	-	-
Q303C	Alacsony	-	-
M306C	Alacsony	Alacsony	Alacsony
S307C	Közepes	Közepes	Közepes
L308C	Nem sikerült a mutáció		
A309C	Magas	Magas	Legmagasabb
I310C	-	-	Alacsony
L311C	-	-	Alacsony

1. táblázat A megfelelő intenzitású fluoreszcens jelet adó S3-S4 cisztein pontmutáció és cisztein specifikus fluoreszcens festékpár meghatározása Kv1.3 esteén TEVCF technikával

A Kv1.3 ioncsatornán a TEVCF mérések megkezdése előtt meghatároztuk azt a cisztein pontmutációs helyet és ciszteinre specifikus fluoreszcens festékpárt, amely segítségével a legnagyobb intenzitású, feszültségfüggő fluoreszcens jelet tudjuk detektálni, a csatorna kapuzását jellemző alapvető biofizikai paraméterek megváltozása

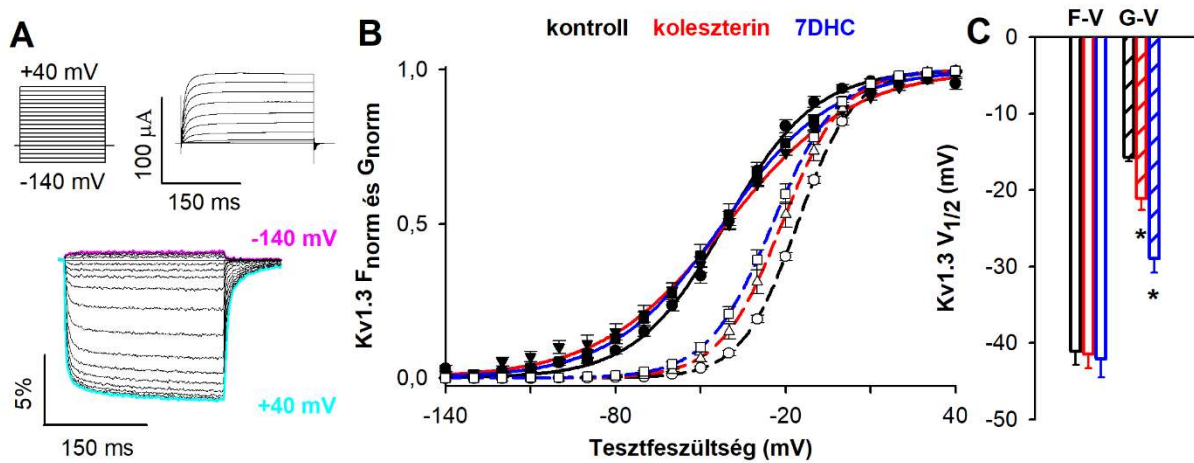
nélkül. Ehhez egyenként cisztein pontmutációkat hoztunk létre a $K_{V1.3}$ S3-S4 linkerén (301-től a 311-es pozícióval bezárólag), majd háromféle ciszteinre specifikus fluoreszcens festékkel (AlexaFluor488-maleimid; tetrametilrodamin (TMRM)-maleimid; 2-((5(6)-tetrametilrodamin)karboxilamino)etil metántiosulfonát (MTS-TAMRA)) jelöltük meg azokat, és vizsgáltuk, hogy létrejön-e feszültségfüggő fluoreszcenciás jel, és ha igen, az milyen intenzitású. A megfelelő intenzitású, feszültségfüggő fluoreszcens jel jelenléte ugyanis alapvető a VSD mozgásának leírásához, ugyanis csak ilyen feltételek mellett határozhatók meg a számunkra szükséges egyensúlyi aktivációs és kinetikai paraméterek. A mérések alapján a 309-es pozíciójú mutáció az MTS-TAMRA festékkel bizonyult a legalkalmasabbnak, ezért a későbbiek során ezt a mutáció-festékpárt alkalmaztuk a TEVCF mérések során.

Az A309C mutáns megőrizte a $K_{V1.3}$ alapvető kapuzási tulajdonságait (v.ö.: **6.** és **7. ábra**), bár a legtöbb TEVCF méréshez létrehozott cisztein mutációhoz hasonlóan kissé módosította a konduktancia feszültségfüggését leíró $G_{\text{norm}}-V$ görbét. Az A309C jelölése MTS-TAMRA fluoreszcens festékkel adta a legnagyobb intenzitású fluoreszcens jelet (**1. táblázat**), ezért a kísérletek során ezt a festéket használtuk AlexaFluor488 vagy tetrametilrodamin-maleimid (TMRM) helyett. A $K_{V1.3}$ -ban nincsenek natív extracelluláris ciszteinnek, ami ezáltal kizárja a csatorna nonspecifikus jelölődésének lehetőségét. Mivel a disszertáció további része elsősorban az elektrofiziológiai kísérletekhez használt cisztein mutánsokkal nyert eredményeket írja le, a továbbiakban a $K_{V1.3}$ és $K_{V10.1}$ a módszer során használt mutánsokat (A309C a $K_{V1.3}$ esteén, illetve L322C a $K_{V10.1}$ esetén) jelölik, míg a ciszteineket nem tartalmazó variánsokra vad típusú (WT $K_{V1.3}$, illetve WT $K_{V10.1}$) csatornaként utalunk. A bemutatott cisztein mutációt hordozó csatornákkal kapott eredményeket MTS-TAMRA jelölés után kaptuk, a be nem mutatott mérések alapján ugyanakkor a festék alkalmazása nem befolyásolta szignifikáns módon a vizsgált elektrofiziológiai paramétereket vagy a szterolok hatását.

A $K_{V1.3}$ A309C csatornákat kifejező *Xenopus laevis* oocitákat -100 mV-os tartófeszültségről kiindulva különböző tesztpotencialokra depolarizáltuk -140 és $+40$ mV között 10 mV-os lépésekben, 250 ms-on keresztül 30 s-onként. Az ekkor kialakuló ionáramokat és fluoreszcens jeleket TEVCF módszerrel egyidejűleg detektáltuk (**7A ábra**) és így megkaptuk az áram-feszültség (I-V) és relatív fluoreszcencia intenzitás változásának feszültségfüggését leíró $\Delta F/F-V$ görbéket. Ezekből a görbékből az Anyagok és módszerek fejezetben részletezetteknek megfelelően a normált konduktancia-feszültség ($G_{\text{norm}}-V$) és normált fluoreszcencia változás-feszültség ($F_{\text{norm}}-V$) összefüggéseket számítottuk, és határoztuk meg azok félaktivációs feszültségét ($V_{1/2}$) és a meredekségi együtthatót (k) (**7B ábra**). A várakozásoknak megfelelően az $F_{\text{norm}}-V$ görbét jellemző félaktivációs feszültség hiperpolarizáltabb volt a $G_{\text{norm}}-V$ görbe félaktivációs feszültségéhez képest ($V_{1/2} = -41,1 \pm 1,8$

mV (n=12) vs. $-15,8 \pm 0,5$ mV (n=10)), amely arra utalt, hogy a VSD aktivációja negatívabb potenciálokön elkezdődik, mint a pórus nyitása.

A kísérleteket a kontroll mérések után koleszterinnel, illetve 7DHC-val töltött sejteken is elvégeztük. Mindkét szterol hiperpolarizáció irányú, kismértékű, de szignifikáns eltolódást okozott a pórus nyitását jellemző $G_{\text{norm}}-V$ görbéken ($V_{1/2} = -15,8 \pm 0,5$ mV (n=10) kontroll; $-21,1 \pm 1,5$ mV (n=11), $p = 0,049$ koleszterin; és $-29,0 \pm 1,9$ mV (n=12), $p=0,001$ 7DHC esetén), míg a VSD mozgását leíró $F_{\text{norm}}-V$ görbe félaaktivációs feszültségértékét nem befolyásolta a szterolokkal történő előzetes kezelés ($V_{1/2} = -41,1 \pm 1,8$ mV, n=12 kontroll; $-41,5 \pm 1,8$ mV, n=11, $p = 0,992$ koleszterin; és $-42,1 \pm 2,4$ mV, n=12, $p=0,937$ 7DHC esetén) (7B, C ábrák). Ez arra utal, hogy a szterolok nem a VSD aktivációra, hanem közvetlenül a pórusra vagy a két domén közötti csatolási mechanizmusra hatnak. A kezelések az $F_{\text{norm}}-V$ görbék meredekségeit kismértékben megváltoztatták, a koleszterin a VSD feszültségfüggését leíró görbe szignifikáns ellapulását eredményezte ($k = 15,4 \pm 0,4$, n=12 kontroll; $22,2 \pm 1,8$, n=11, $p=0,002$ koleszterin; és $18,7 \pm 0,8$, n=12, $p=0,099$ 7DHC esetén) (7B ábra).

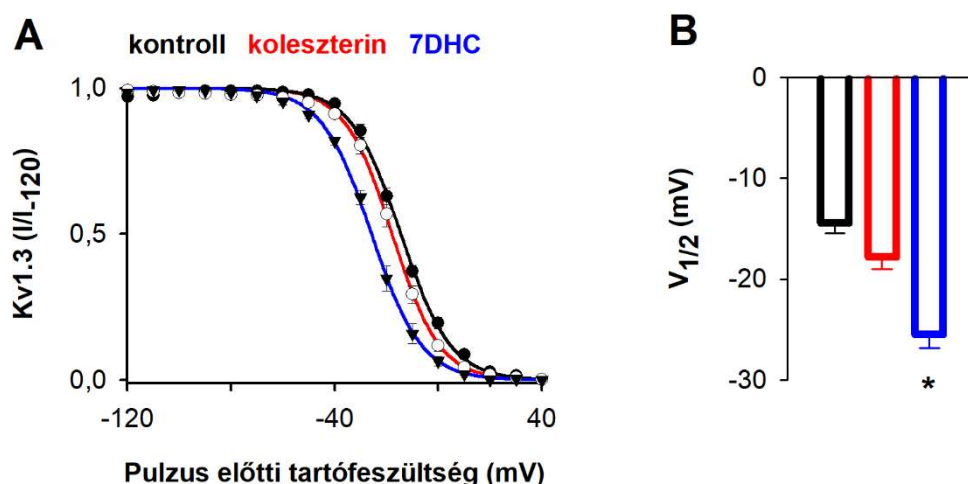


7. ábra Szterol töltések hatásai az A309C mutációt hordozó Kv1.3 csatorna egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggésére

(A) A Kv1.3 csatorna esetén az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését jellemző fluoreszcens jelek ($\Delta F/F$) és ionáramok meghatározásához az oocitákat -100 mV-os feszültségen tartottuk, majd -140 és $+40$ mV közötti tartományban 10 mV-os lépésekben változtatott tesztpotenciálokkal depolarizáltuk 30 s-onként. A depolarizáló pulzus időtartama 250 ms volt. Az A panelen a feszültségprokollokat (bal felül) és az általuk kiváltott áramokat (jobb felül) ábrázoltuk. A Kv1.3 csatornák MTS-TAMRA-val történő jelölést követően egyfázisú fluoreszcens jelet bocsátottak ki a membrán depolarizációjakor, amint az az A panel alsó részén is látszik. (B) Az egy grafikonon ábrázolt folytonos ($F_{\text{norm}}-V$; 3.6.1.5 egyenlet) és szaggatott ($G_{\text{norm}}-V$; 3.6.1.2 egyenlet) vonalak az $F_{\text{norm}}-V$ (fekete szimbólumok) és $G_{\text{norm}}-V$ (üres szimbólumok) adatpontokra legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényeket mutatják. A C panelen a sejtenként meghatározott $V_{1/2}$ értékek átlagát ábrázoltuk (3.6.1.1 egyenlet). Az üres oszlopok az $F_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit, míg a csíkozott oszlopok a $G_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit mutatják. A grafikonokon a minták sorrendje minden paraméter esetén elsőként a kontroll (fekete), majd a koleszterinnel (piros), illetve 7DHC-val (kék) kezelt minta. Kv1.3 ioncsatornánál a $G_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit mind a

koleszterin, mind pedig a 7DHC szignifikánsan (*: $p < 0,05$) megváltoztatta hiperpolarizáció irányába, míg a szterol kezelések az $F_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit nem változtatták meg ($n=8-12$).

A $K_v1.3$ csatorna feszültségfüggő kapuzásának egyik fontos jellemzője, hogy negatív membránpotenciálokon a csatornák egy része inaktívált állapotba megy át, amit egyensúlyi inaktívációnak (SSI) nevezünk. A koleszterin hatását a $K_v1.3$ egyensúlyi inaktívációjára korábban nem vizsgálták. A $K_v1.3$ 309C egyensúlyi inaktívációját leíró SSI görbe hasonlóan viselkedett, mint a korábban leírt $G_{\text{norm}}-V$ görbe, azaz balra tolódott a szterolok hatására, bár az eltérés csak a 7DHC esetén bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (**8. ábra**).

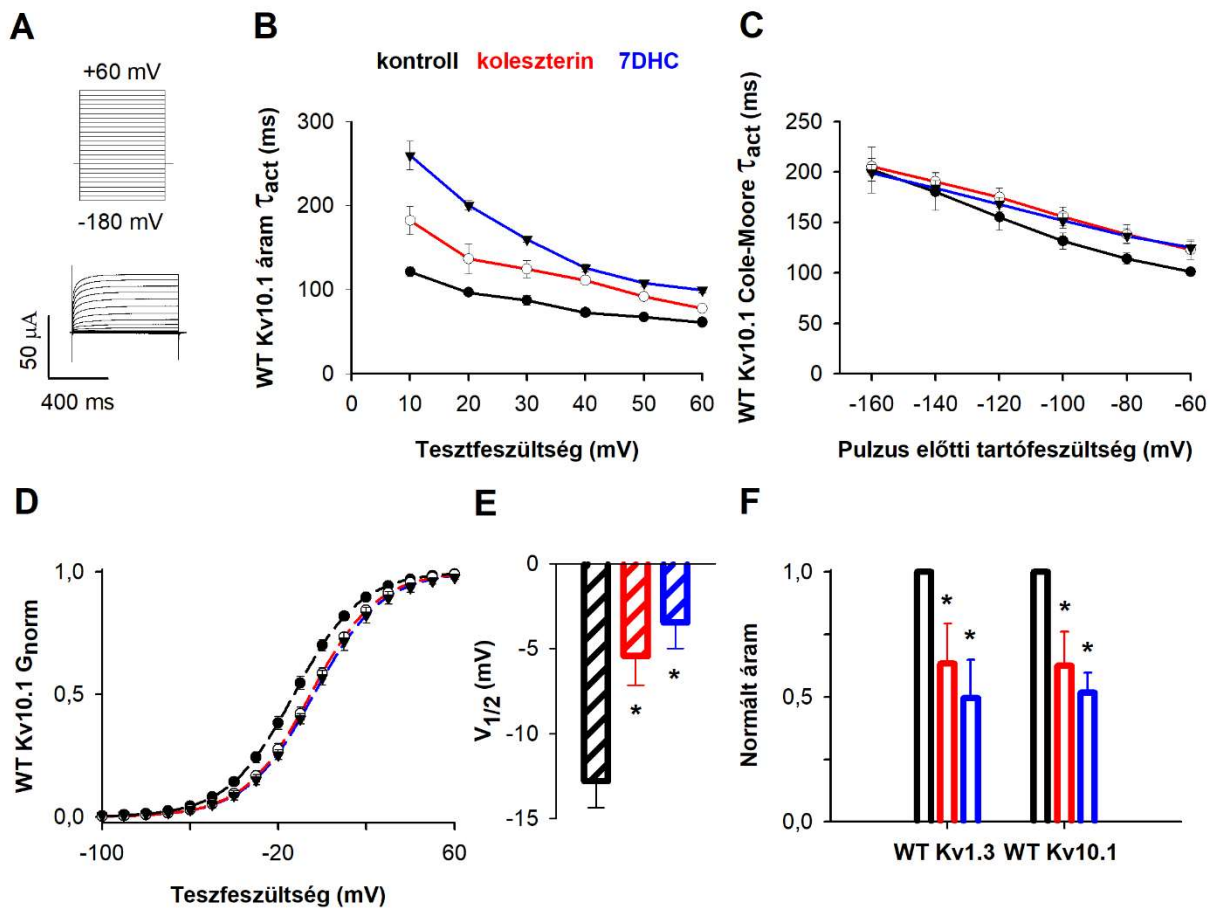


8. ábra Szterolok hatásai a $K_v1.3$ 309C egyensúlyi inaktívációjának feszültségfüggésére

Az egyensúlyi inaktíváció feszültségfüggésének vizsgálatára a sejteket -120 mV és $+40$ mV közötti ($\Delta V = 10$ mV) tartományba eső feszültségen tartottuk 20 s-ig, majd egy 100 ms hosszúságú $+40$ mV-os teszt pulzust alkalmaztunk a K^+ áramok kiváltására. A nem inaktíváló csatornák hányadát az I/I_{-120} képlettel határoztuk meg, ahol I az adott pulzus előtti tartófeszültségről a depolarizáció által kiváltott csúcsáram nagysága, míg I_{-120} a -120 mV-os tartófeszültségről történő depolarizáció által kiváltott csúcsáram nagysága (**A**). Az egyensúlyi inaktíváció feszültségfüggését leíró pontsorokhoz Boltzmann-függvényt (folytonos vonalak; 3.6.1.5 egyenlet) illesztettünk (kontroll: fekete kör, fekete vonal; 7DHC töltés: fekete háromszög, kék vonal; koleszterin töltés: üres körök, piros vonal). A **B** panelen az illesztés eredményeként kapott, sejtenként külön-külön meghatározott $V_{1/2}$ értékek átlagai láthatóak ($n=7-8$). Kontroll: fekete oszlopok; koleszterin töltés: piros oszlopok; 7DHC töltés: kék oszlopok, *: $p < 0,05$.

4.2 Szterolok hatása a $K_v10.1$ feszültségfüggő kapuzásának egyensúlyi és kinetikai paramétereire

Az oocitákban kifejeztetett vad típusú $K_v10.1$ csatornák esetén hasonló eltéréseket tapasztaltunk a sejtmembrán szteroltartalmának növelése hatására, mint $K_v1.3$ -ban, azaz a kezelések lecsökkentették az áram amplitúdóját, lassították az áram aktivációs kinetikáját és a $G_{\text{norm}}-V$ görbe jobbra tolódását eredményezték (**9. ábra**). Ezek a megfigyelések ellentétesek a koleszterin kivonás vad típusú $K_v10.1$ -re gyakorolt hatásaival, amelyeket korábban már leírtak

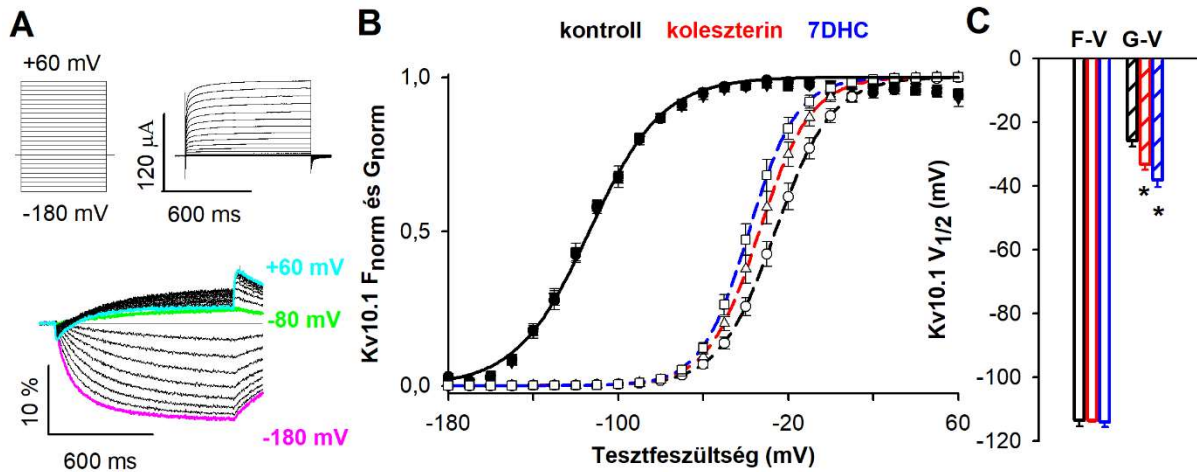


9. ábra A szterol töltések hatásai a vad típusú Kv10.1 csatornára

Az A panel az általunk alkalmazott feszültségprotokollt, valamint az ennek hatására kiváltott vad típusú Kv10.1 ionáramokat mutatja az oocita expressziós rendszerben. Az ionáramok meghatározásához az oocitákat -100 mV-os feszültségen tartottuk, majd -180 és $+60$ mV közötti tartományban 10 mV-os lépésekben változtatott tesztpotenciálokkal depolarizáltuk 10 s-onként. A depolarizáló pulzus időtartama 800 ms volt. (B) Az aktivációs időállandóinak (τ_{act}) meghatározásához elsőfokú exponenciális függvényeket illesztettünk a különböző tesztpotenciálokon mért ionáramokhoz (3.6.1.3 egyenlet) és ezek átlagait tüntettük fel kontroll (fekete körök, fekete vonal), koleszterinnel (üres körök, piros vonal) vagy 7DHC-vel kezelt sejtek (fekete háromszög, kék vonal) esetén. Mindkét szterollal történő töltés hatására a τ_{act} szignifikánsan megnövekedett minden vizsgált feszültség esetén ($n=3-9$). (C) A szterolok Cole-Moore shiftre gyakorolt hatásainak vizsgálatához meghatároztuk a -160 és -60 mV közötti tartófeszültségek mellett a $+40$ mV-os depolarizáló pulzus által kiváltott áramok aktivációs időállandóit és ábrázoltuk az így kapott értékeket a tartófeszültség függvényében ($n=7-8$). A vonalak és a szimbólumok kódja a B pannellel egyezik. (D) A grafikonon ábrázolt szaggatott (G_{norm} -V) vonalak a G_{norm} -V adatpontokra legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényeket mutatják (lásd Anyagok és módszerek fejezet, 3.6.1.2 egyenlet). A vonalak és a szimbólumok kódja a B pannellel egyezik. (E) A $V_{1/2}$ értékek meghatározása a 3.6.1.1-es egyenlet alapján történt ($n=7-11$). A grafikonokon a kontroll, a koleszterinnel, illetve 7DHC-vel kezelt mintából származó átlagolt $V_{1/2}$ értékeket rendre fekete, piros és kék színű satírozott oszlopokkal jelenítettük meg. (F) A koleszterin és 7DHC kezelés szignifikáns mértékben lecsökkentette az oocitákban a teljes sejtben mérhető áramok nagyságát mind a vad típusú Kv1.3, mind Kv10.1 vizsgálata esetén. Az áramok nagyságát az ugyanazon a napon mért kontroll sejtek áramainak átlagára normáltuk ($n=3-5$ nap). A grafikonokon a kontroll, a koleszterinnel, illetve 7DHC-vel kezelt mintából származó átlagolt normált áram értékeket rendre fekete, piros és kék színű oszlopokkal jelenítettük meg. *: $p < 0,05$.

A Kv10.1-en végzett TEVCF mérésekhez a korábban mások által már használt és jellemzett L322C mutánst alkalmaztuk¹⁹⁴, azzal a különbséggel, hogy kísérleteink során MTS-

TAMRA fluoreszcens festéket alkalmaztunk TMRM helyett. Ez az új mutáció-festék párosítás a korábbinál nagyobb amplitúdójú, többfázisú, feszültségfüggő fluoreszcens jel megjelenését eredményezte (**10A ábra**) a csatorna kapuzási paramétereinek szignifikáns megváltozása nélkül (**9. és 10. ábra**). Az I-V és $\Delta F/F$ -V görbék felvételéhez -180 és $+60$ mV között 10 mV-os lépésekben növekvő, 800 ms-ig tartó depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. A pulzusokat -100 mV-os tartófeszültségről kiindulva alkalmaztuk 10 s-onként. A korábbi eredményekkel összehangban a VSD aktivációja $K_V10.1$ -ben már igen negatív potenciálok mellett megjelenik ($F_{\text{norm-V}}: V_{1/2} = -113,6 \pm 1,9$ mV; $n=9$), míg a pórus nyitása a $K_V1.3$ -ban megfigyeltékhez hasonló tartományban történik ($G_{\text{norm-V}}: V_{1/2} = -25,8 \pm 2,1$ mV; $n=8$) (**10B, C ábrák**). Emiatt a VSD aktivációja és a pórus nyitása közötti feszültségkülönbség jóval nagyobb $K_V10.1$ esetén, mint $K_V1.3$ -ban, amely a két funkcionális domén közötti, a bevezetésben is bemutatott lazább csatolási mechanizmusra utal. A szterolok $K_V10.1$ -re gyakorolt hatása hasonlóan bizonyult a $K_V1.3$ esetén tapasztaltakhoz. Mind a koleszterin, mind pedig a 7DHC szignifikáns negatív irányú eltolódást okozott a $G_{\text{norm-V}}$ görbében ($V_{1/2} = -25,8 \pm 1,8$ mV ($n=8$) kontroll, $-33,2 \pm 1,8$ mV ($n=8$), $p = 0,043$ koleszterin töltés és $-38,2 \pm 2,2$ mV, $p=0,002$ ($n=9$) 7DHC töltés esetén), ugyanakkor egyik kezelés sem változtatta az $F_{\text{norm-V}}$ görbe félaktivációs feszültségét ($V_{1/2} = -113,6 \pm 1,9$ mV ($n=9$) kontroll, $-113,5 \pm 0,6$ mV ($n=9$), $p = 0,999$ koleszterin töltés és $-114,0 \pm 1,6$ mV ($n=8$), $p= 0,981$ 7DHC töltés esetén) (**10C ábra**). Ezek alapján $K_V10.1$ esetén, $K_V1.3$ -hoz hasonlóan, a szterollokkal történő töltés valószínűsíthetően nem a VSD aktiváció módosításán keresztül változtatja meg a PD működését.



10. ábra Szterol töltések hatásai az L322C mutációt hordozó Kv10.1 egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggésére

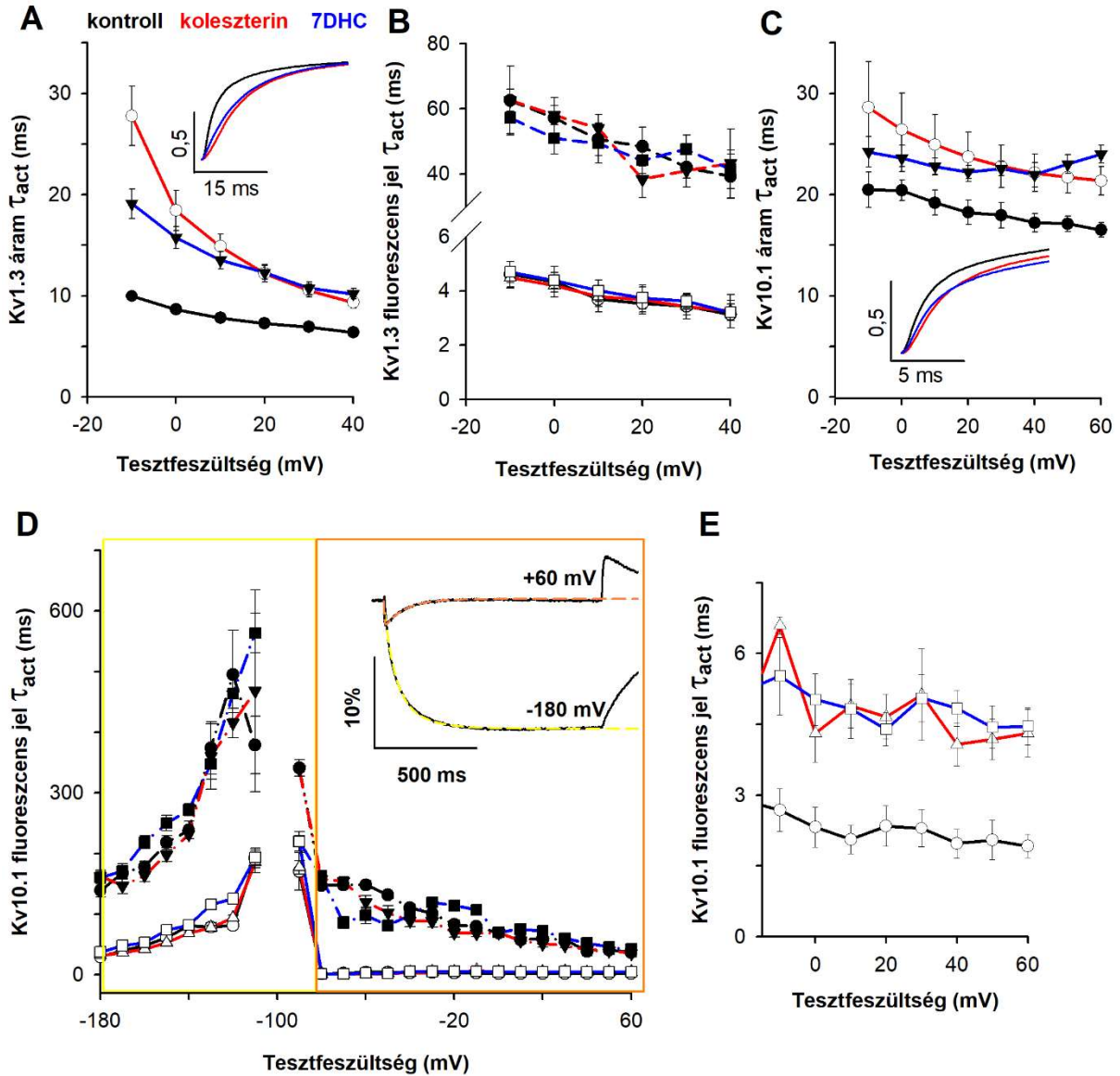
(A) A Kv10.1 csatornák esetén az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését jellemző fluoreszcens jelek ($\Delta F/F$) és ionáramok meghatározásához az oocitákat -100 mV-os feszültségen tartottuk, majd -180 és $+60$ mV közötti tartományban 10 mV-os lépésekben változtatott tesztpotenciálokkal depolarizáltuk 10 s-onként. A depolarizáló pulzus időtartama 800 ms volt. A feszültségprokollokat (bal felül) és az általuk kiváltott áramokat (jobb felül) az A panelen ábrázoltuk. A Kv10.1 csatornák MTS-TAMRA-val történő jelölést követően kétfázisú fluoreszcens jelet bocsátottak ki a membrán depolarizációjakor, amint az az A panel alsó részén is látszik. (B) Az egy grafikonon ábrázolt folytonos ($F_{\text{norm}}-V$; 3.6.1.5 egyenlet) és szaggatott ($G_{\text{norm}}-V$; 3.6.1.2 egyenlet) vonalak az $F_{\text{norm}}-V$ (fekete szimbólumok) és $G_{\text{norm}}-V$ (üres szimbólumok) adatpontokra legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényeket mutatják be. Kv10.1-nél a legjobban illeszkedő $F_{\text{norm}}-V$ görbék mindhárom esetben teljesen átfednek egymással, ezért itt egy görbét tüntettünk csak fel az ábrán. A C panelen a sejtenként kapott adatokból származó $V_{1/2}$ értékek átlagát ábrázoltuk (3.6.1.1 egyenlet). Az üres oszlopok az $F_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit, míg a csíkozott oszlopok a $G_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit mutatják. A grafikonokon a minták sorrendje minden paraméter esetén elsőként a kontroll (fekete), majd a koleszterinnel (piros), illetve 7DHC-val (kék) kezelt minta. Kv10.1 ioncsatornánál (hasonlóan a Kv1.3 ioncsatornához; 7. ábra) a $G_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit mind a koleszterin, mind pedig a 7DHC szignifikánsan (*: $p < 0,05$) megváltoztatta hiperpolarizáció irányába, míg a kezelések az $F_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékeit nem változtatták meg ($n=8-12$).

4.3 Szterolok hatása a VSD és az ionáram aktivációs kinetikájára

Következő lépésben a szterol töltések VSD aktivációs és áramaktivációs kinetikára gyakorolt hatásait vizsgáltuk meg az A309C Kv1.3 és a L322C Kv10.1 konstrukt felhasználásával (11. ábra). A Kv1.3 áram aktivációs kinetikájának meghatározásához az ionáramokra egykomponensű exponenciális függvényt illesztettünk, az aktivációs kinetikát a τ_{act} időállandóval jellemeztük. A 11A ábra az mutatja, hogy mind a koleszterin, mind a 7DHC hatására az áram aktivációs kinetikája szignifikáns mértékben lelassult. Ezt jól demonstrálják az időállandók változásain túl ($p < 0,05$ minden feszültségen) az egymásra normált áramgörbék is (11A betét ábra). A VSD aktivációs kinetikáját jellemző fluoreszcens jelek esetén egy, az amplitúdó döntő részét ($>85\%$ -át) meghatározó gyors és egy kisebb amplitúdójú lassabb komponens volt megfigyelhető. Ennek megfelelően a fluoreszcenciás jel aktivációs kinetikáját két exponenciális tag összegét tartalmazó függvénnyel lehetett jól illeszteni. A két komponens

jellemző időállandók egyikét sem változtatta meg a sejtmembrán szterollokkal történő töltése (**11B ábra**). Emellett az egyes komponensek amplitúdóinak aránya sem változott szignifikáns mértékben a szterol töltések hatására (az adatok a dolgozatban nem kerültek bemutatásra).

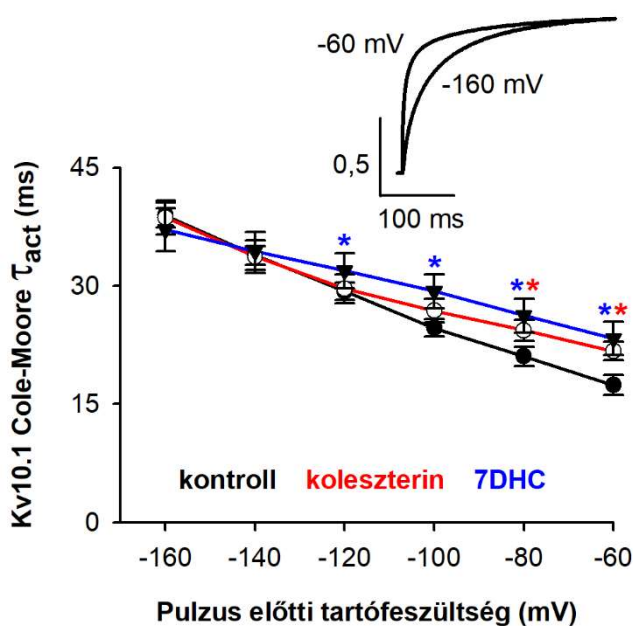
A $K_v10.1$ áram aktivációs kinetikája a depolarizáló pulzus előtti tartófeszültségtől és a külső Mg^{2+} koncentrációtól függően komplex, szigmoid görbével írható le, szemben a $K_v1.3$ ionáram elsődokú, egy exponenciális taggal jellemezhető aktivációs kinetikájával. Azért, hogy a szterolok aktivációs kinetikára gyakorolt hatásait különböző csatornákon összehasonlíthassuk, az irodalomban elfogadott eljárás szerint^{194,195} a $K_v10.1$ áram kezdeti szigmoid fázisát nem vettük figyelembe az illesztés során, csak az ionáram aktivációs kinetikájának elsődokú, egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel jellemezhető részét karakterizáltuk. Mind a koleszterin, mind a 7DHC kezelés megnövelte az áram aktivációs időállandóját, különösen jelentős depolarizációk esetén (**11C ábra**). Ezután a szterolok VSD aktivációs kinetikára gyakorolt hatásait vizsgáltuk a -180 és $+60$ mV közötti tartományban. A **11D** betét ábráján -180 és $+60$ mV-okon mért reprezentatív fluoreszcens jeleket tüntettünk fel. A hiperpolarizáló (-180 és -110 mV közötti) membránpotenciálok a mélyebb zárt állapotok felé irányuló, a depolarizáció során tapasztalhatóhoz képest ellentétes irányú VSD mozgást jellemző fluoreszcens jelek két, erőteljesen feszültségfüggő kinetikai komponenssel rendelkeztek, amelyek egyike sem változott meg a szterol töltések hatására (**11D ábra**). Ezzel szemben a depolarizáló (-100 és $+60$ mV közötti) pulzusok két ellentétes polaritású komponensből álló bifázisos jelet váltottak ki, amelyben az depolarizáló impulzus kezdetén megjelenő, negatív polaritású gyors komponens egyre prominensebbé vált a pozitívabb membránpotenciálok esetén (**10A ábra**). Valószínű, hogy ez a gyors komponens egy, a pórus nyitáshoz szorosan kapcsolt VSD átmenetet tükrözött a kinetikája és azon feszültségtartomány alapján, ahol a jel megfigyelhető. A lassú komponens időállandója jelentős feszültségfüggést mutatott és nem változott szterol kezelés hatására, míg a gyors komponens nagyon kis mértékben függött az alkalmazott feszültségtől, viszont szignifikáns mértékben lassult a koleszterin és a 7DHC alkalmazása esetén (**11D, E ábrák**). Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy a szterolok nem befolyásolják a VSD mély zárt állapotok közötti átmeneteit, lassítják ugyanakkor a pórus nyitásával összefüggő konformációváltozásait.



11. ábra Szterol töltések hatásai az áram és a VSD aktivációs kinetikáira

A $K_V1.3$ és $K_V10.1$ áramok és fluoreszcens jelek kinetikai paramétereinek vizsgálatához a 7. és 10. ábrákon leírt protokollt használtuk. (A, C) Az ionáramok aktivációs időállandóinak (τ_{act}) meghatározásához elsőfokú, egy exponenciális tagot tartalmazó függvényeket (3.6.1.3 egyenlet) illesztettünk kontroll (fekete körök, fekete vonal), koleszterinnel (üres körök, piros vonal) vagy 7DHC-vel kezelt sejtek (fekete háromszög, kék vonal) ionáramaira. A betét ábrák kontroll (fekete), koleszterinnel (piros), illetve 7DHC-vel kezelt sejtekről (kék) nyert normált áramgörbéket mutatnak. (B, D) A fluoreszcens jelek esetén az illesztés elsőfokú, két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel történt (3.6.1.4 egyenlet). Az (A) panelen a $K_V1.3$ áram aktivációs időállandói ($n=7-11$), míg a (B) panelen a fluoreszcens jel gyors (üres szimbólumok) és lassú (fekete szimbólumok) komponensének aktivációs időállandói ($n=4-8$) láthatóak a tesztfeszültség függvényében. A (C) panel a $K_V10.1$ áramok aktivációs időállandóit mutatja ($n=4-8$). A (D) panelen a -100 mV-os tartófeszültségről kiinduló tesztpotenciálok által kiváltott fluoreszcens jelek gyors (üres szimbólumok) és lassú (fekete szimbólumok) komponenseinek időállandóit ábrázoltuk a tesztfeszültség függvényében. A betét ábrán a hiperpolarizáló (-180 és -110 mV közötti, sárga négyzet) és depolarizáló (-90 és $+60$ mV közötti, narancssárga négyzet) feszültségek esetén a $K_V10.1$ ioncsatorna fluoreszcens jeleire legjobban illeszkedő, két exponenciális tagot tartalmazó függvényeket tüntettük fel. Az (E) panelen a gyors komponens depolarizáló feszültségek esetén kapott értékeit ábrázoltuk a tesztfeszültség függvényében nagyított skálán kontroll (üres körök, fekete vonal), koleszterinnel (üres háromszög, piros vonal) és 7DHC-vel (üres négyzet, kék vonal) töltött sejtek esetén ($n=5-10$).

A $K_v10.1$ csatornák karakterisztikus tulajdonsága a Cole-Moore shift jelensége, azaz az áram aktivációs kinetikájának módosulása a depolarizáció előtti tartófeszültség függvényében¹⁹⁶. Amikor a csatornák nagyon negatív tartófeszültségről aktiválódnak, több zárt állapotban kell áthaladniuk a nyitás előtt, amelynek hátterében strukturálisan a csatorna VSD és PAS doménjei közötti kölcsönhatás áll¹⁷. A jelenség következményeként, amikor a csatornát negatívabb tartófeszültségekről depolarizáljuk, az áram aktivációs kinetikája lassabb és a kezdeti szigmoid fázis kifejezettebb, mivel a csatornák aktivációja ilyenkor a mélyebb zárt állapotokból indul (12. ábra). A jelenség vizsgálatához +40 mV-os depolarizáló pulzusok által kiváltott áramok aktivációs kinetikáját hasonlítottuk össze a pulzus előtti tartófeszültség függvényében. A tartófeszültség értékét -160 és -60 mV közötti tartományban változtattuk kontroll és szterolokkal töltött sejtekben. Míg a kezdeti legnegatívabb tartófeszültségek mellett (-160 és -140 mV) a kontroll és a szterolokkal töltött sejtekben az időállandók értékei hasonlóak voltak, addig -120 mV-os vagy annál pozitívabb tartófeszültség alkalmazása esetén az áramaktivációs kinetika szignifikánsan lassabbnak bizonyult a szterolokkal kezelt esetekben. Ez arra utal, hogy a mély zárt állapotok közötti átmenetek nem változnak, viszont az utolsó, csatornanyitást eredményező átmenet lelassul szterol töltések hatására.



12. ábra A Cole-Moore shift változása szterolok hatására $K_v10.1$ csatornában

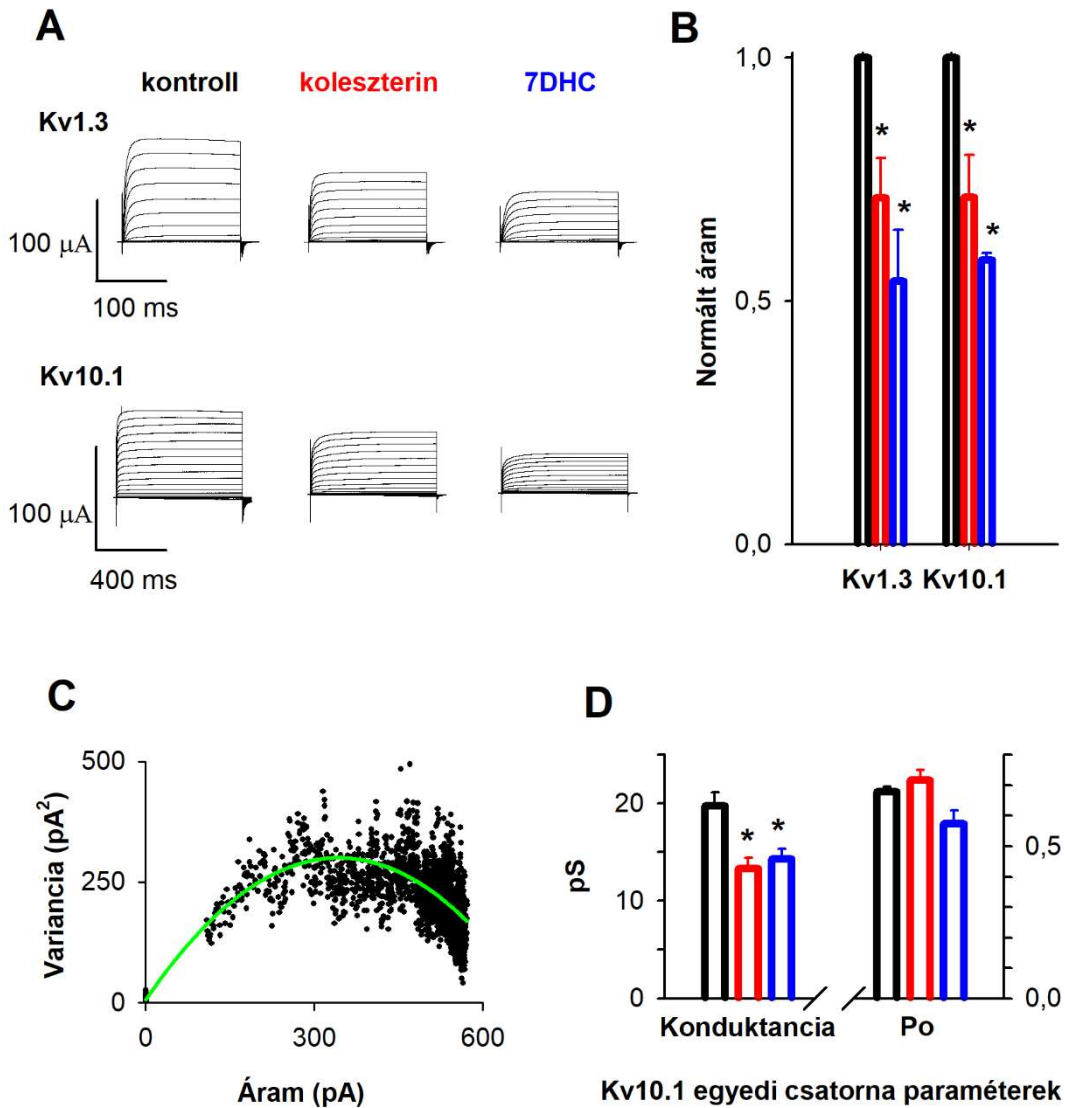
$K_v10.1$ esetén a szterolok Cole-Moore shiftre gyakorolt hatásának vizsgálatához egy 500 ms hosszúságú +40 mV-os pulzussal depolarizáltuk a sejteket úgy, hogy a pulzus előtt 10 s-ig alkalmazott tartófeszültség értékét -160 és -60 mV között változtattuk 20 mV-os lépésekben. A betét ábra reprezentatív normált $K_v10.1$ áramgörbéket mutat -160 és -60 mV-os pulzus előtti tartófeszültségek esetén. Az áramgörbékre elsőfokú, egy exponenciális tagot tartalmazó függvényt illesztettünk (3.6.1.3 egyenlet) úgy, hogy a kezdeti szigmoid fázist nem vettük figyelembe. Koleszterin (üres kör, piros vonal) és 7DHC (fekete háromszög, kék vonal) töltés hatására a pozitívabb pulzus előtti tartófeszültségekről kiváltott áramok τ_{act} értékei szignifikánsan növekedtek a kontroll mérések esetén tapasztaltakhoz képest (7DHC esetén -120 és -60 mV, míg koleszterin esetén -80 és -60 mV között) (n=7-8).

4.4 A szterolok által okozott áramcsökkenés mechanizmusának vizsgálata

Jóllehet a sejtek kapacitására vonatkozó információ hiányában az áramsűrűségek adatai nem hasonlíthatók össze közvetlenül egymással, mindkét szterol származék szignifikánsan lecsökkentette az oocitákban mért teljessejt-ionáramok nagyságát mind az A309C K_v1.3, mind pedig az L322C K_v10.1 ioncsatorna esetén azonos mennyiségű RNS injektálása és az injektálás után a mérésig eltelt azonos időtartamok alkalmazása mellett (**13A ábra**). A K_v1.3 esetében a koleszterin $71,1 \pm 8,2\%$ -ra, a 7DHC pedig $54,0 \pm 10,6\%$ -ra csökkentette az áramok nagyságát, míg a K_v10.1 esetén a szterollokkal történő kezelések után az amplitúdók rendre a kontroll érték $71,3 \pm 8,6\%$ és $58,5 \pm 1,3\%$ -ára csökkentek (**13B ábra**).

Az áramredukció okának meghatározására, vagyis annak eldöntésére, hogy az egyedi csatornák vezetőképességének vagy nyitási valószínűségének csökkenése okozza a teljes sejt ionáramának csökkenését, a K_v10.1 csatornákat expresszázó oocitákon patch-clamp technika segítségével, outside-out konfigurációban az Anyagok és módszerek 3.6.2 fejezetében bemutatott feszültségprotokoll segítségével nyert ionáramokon nem-egyensúlyi zajanalízist végeztünk. Az outside-out konfigurációra a nem-egyensúlyi zajanalízis kivitelezése miatt volt szükségünk. A TEVCF mérésekhez használt erősítő érzékenysége sokkal kisebb, valamint az erősítő elektronikus zaja is sokkal nagyobb, mint a patch-clamp erősítő esetében. A teljes sejtek esetén tapasztalható nagy áramokhoz képest a patch-clamp technika outside-out konfigurációját adó „miniatűr sejtben” sokkal kevesebb csatorna van, a kisebb áramamplitúdó miatt pedig jobb a feszültség-zár minősége, gyorsabb az elektronika, és jóval érzékenyebb erősítés fogja át a mérhető áramok tartományát. Ezáltal a variancia mérése pontosabb kisebb átlagáramok mellett.

A patch-clamp mérések során detektált áram időbeli fluktuációja az egyedi csatornák vezetőképességétől és azok nyitási valószínűségétől függ. Az ionáram varianciáját az egyes időpillanatokhoz tartozó átlag áramerősség függvényében ábrázolva egy parabolát kapunk, amelynek paraméterei segítségével meghatározhatók az egyedi csatornák fenti tulajdonságai (**13C ábra**). A zajanalízis eredményei alapján mindkét szterol szignifikánsan lecsökkentette az egyedi csatornák konduktanciáját (kontroll: $19,73 \pm 1,44$ pS, n=8; koleszterin: $13,30 \pm 1,11$ pS, n=6, p=0,009; 7DHC: $14,33 \pm 1,04$ pS, n=4, p=0,046) a nyitási valószínűségek szignifikáns módosítása nélkül (kontroll: $0,678 \pm 0,018$ n=8; koleszterin: $0,715 \pm 0,035$ n=6, p= 0,628; 7DHC: $0,573 \pm 0,044$ n=4, p=0,067) (**13D ábra**).



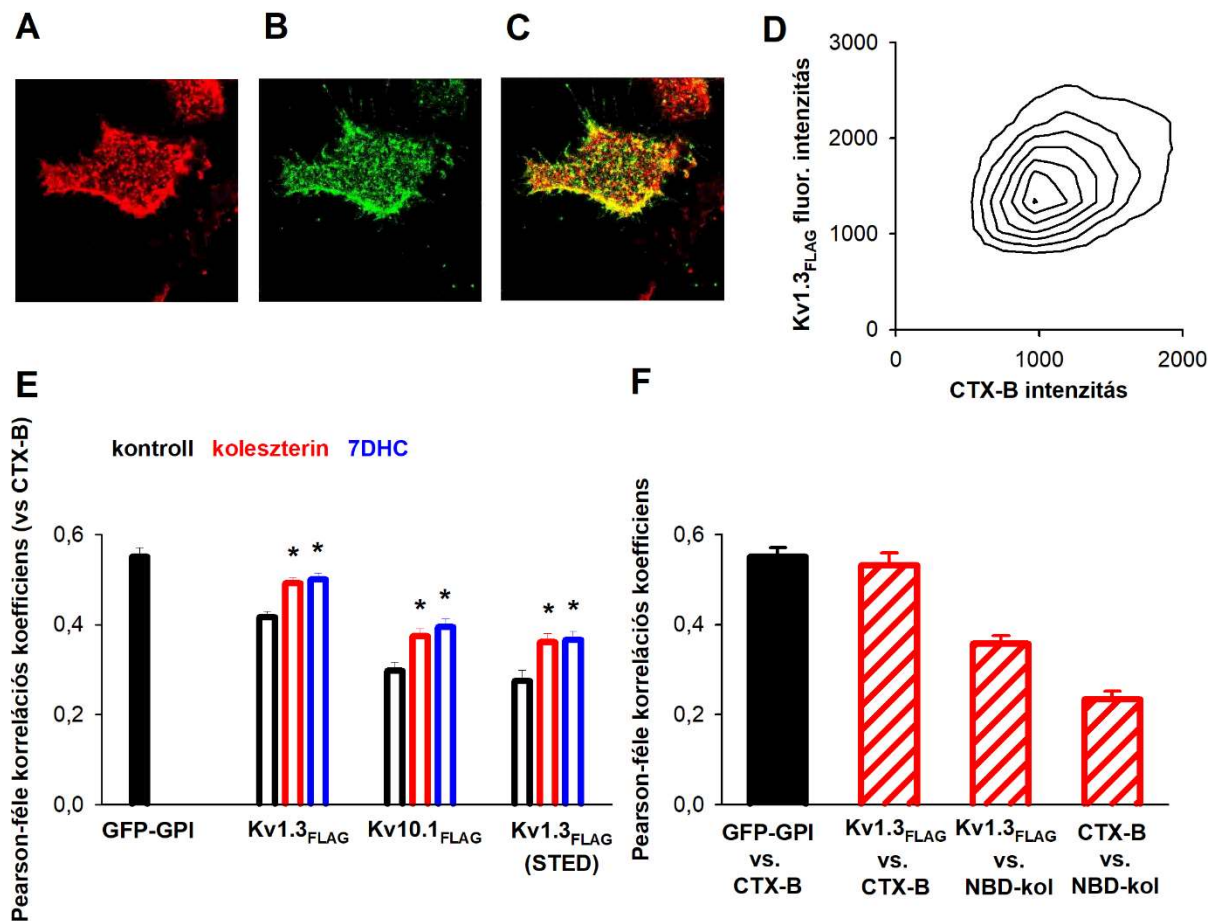
13. ábra A szterol töltések hatása az oociták áramamplitúdójára és az egyedi csatornákat jellemző paraméterekre

Az (A) panel TEVCF segítségével ugyanazon a napon mért kontroll és szterolokkal kezelt oociták reprezentatív áramgörbéit mutatja. (B) Az adott napon mért koleszterinnel vagy 7DHC-val töltött sejtek áramainak átlagát normáltuk az ugyanazon a napon mért kontroll sejteken kapott amplitúdók átlagára. Az így kapott normált áramok átlagát ($n=3-4$ nap) tüntettük fel kontroll (fekete), koleszterinnel (piros) vagy 7DHC-val (kék) töltött sejtekre. Az áramokat $K_v1.3$ esetén $+40$ mV-ra, míg $K_v10.1$ esetén $+60$ mV-ra történő depolarizáló pulzussal váltottuk ki. A C panel az oocitákban expresszált $K_v10.1$ csatornákon kiváltott áramok nem-egyensúlyi zajanalízissel történő kiértékelését mutatja. Az adatgyűjtés során az oociták membránjából húzott outside-out konfigurációjú patch-eket a -100 mV-os tartófeszültségről kiindulva 200 ms-os $+50$ mV-os pulzusokkal depolarizáltuk egymás után 200 alkalommal. Az áram variációját az egyes időpillanatokhoz tartozó átlagos áramerősségek függvényében ábrázoltuk és a $K_v10.1$ egyedi csatorna paramétereit az adatpontokra illesztett parabola segítségével határoztuk meg (3.6.2.1 egyenlet). (D) A grafikonon a csatornák kontroll (fekete), koleszterinnel (piros), illetve 7DHC-val (kék) kezelt sejtekben meghatározott egyedi konduktanciáját és nyitási valószínűségét ábrázoltuk ($n=5-8$). A (B) és (D) paneleken bemutatott oszlopdiagramokon az eredményeket a kontroll, koleszterinnel, illetve 7DHC-val kezelt minták sorrendjében ábrázoltuk. Az ábrán a kontroll mintához képest szignifikáns eltéréseket jelöltük (*, $p < 0,05$, ANOVA után végzett Tukey's HSD teszt alapján).

4.5 A Kv1.3 és Kv10.1 lipidtutajokkal való asszociációjának vizsgálata

Mind a Kv1.3, mind pedig a Kv10.1 csatornákról kimutatták korábban, hogy preferenciálisan a sejtmembrán szfingolipidekben és koleszterinben gazdag lipidtutaj mikrodoménjeiben helyezkednek el^{138,141,197}. Mivel a lipidtutajbeli lokalizáció befolyásolhatja a csatornák szerkezeti és funkcionális tulajdonságait^{138,197-199}, valamint a koleszterin a tutajok egyik legfontosabb alkotóeleme⁸⁵, a csatornák és tutajok szterol töltés hatására végbemenő átrendeződése szerepet játszhat a szterolok elektrofiziológiai hatásainak kialakulásában, ahogy azt a Bevezetésben is részletesen bemutattuk. Ennek alátámasztására megvizsgáltuk a Kv1.3 és Kv10.1 tutaj és nem-tutaj mikrodomének közötti megoszlásának szterol töltés hatására bekövetkező változását oly módon, hogy meghatároztuk az ioncsatornához kötődő antitest és a lipidtutaj jelölőként használt koleratoxin B alegység (CTX-B) fluoreszcencia intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs együttható nagyságát hagyományos konfokális lézer pásztázó és stimulált emisszió depléció (STED) mikroszkópia segítségével a korábban részletesen leírt módon¹⁹². A fluorofórral konjugált antitestek a Kv1.3 és Kv10.1 csatornába épített FLAG epitópot ismerték fel (Kv1.3_{FLAG} és Kv10.1_{FLAG}). A korábbi megfigyelésekkel összhangban markánsan pozitív Pearson-együtthatókat kaptunk a Kv1.3, illetve Kv10.1 és a CTX-B fluoreszcens jele között (Kv1.3 vs CTX-B: $0,416 \pm 0,013$, n=27 és Kv10.1 vs CTX-B: $0,298 \pm 0,019$, n=30, **14E** és **2. táblázat**). A számított együtthatók jelentősen kívül estek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható 95%-os konfidencia intervallum határain (**2. táblázat**) és nagyságuk összemérhető volt a pozitív kontroll minta esetén számított értékkel, amelyet két általánosan elfogadott lipidtutaj marker, a GFP-GPI és a CTX-B fluoreszcencia intenzitásai közötti koefficiens kvantifikálásával kaptunk ($0,551 \pm 0,020$, n=23, **14E** és **2. táblázat**). A pozitív kolokalizáció jól látszik az egymásra vetített konfokális felvételeken (**14A-C ábrák**) és a pixelenkénti intenzitások korrelációját bemutató reprezentatív kontúr plot ábrán is (**14D ábra**). Mindkét ioncsatorna esetén a Pearson-együtthatók nagysága szignifikánsan megnőtt mind koleszterin, mind 7DHC kezelés hatására konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján (Kv1.3: $0,492 \pm 0,013$, n=34, p=0,001 koleszterin és $0,500 \pm 0,015$, n=32, p=0,001 7DHC esetén; Kv10.1: $0,373 \pm 0,017$, n=29, p=0,010 koleszterin és $0,395 \pm 0,018$, n=24, p=0,002 7DHC esetén, **14E ábra** és **2. táblázat**). Kv1.3 esetén a szterolok hatására megnövekedett tutajbeli lokalizációt megerősítettük jobb (46-60 nm) feloldóképességű STED mikroszkópia alkalmazásával. Szterol töltés után a korrelációs koefficiensek nagysága STED felvételekből számítva is szignifikánsan pozitívabb volt (koleszterin: $0,361 \pm 0,019$,

n=32, p=0,012, 7DHC: $0,366 \pm 0,019$, n=28, p=0,010), mint a kontroll minták esetén ($0,274 \pm 0,025$, n=25) (**14E ábra** és **2. táblázat**). A fluoreszcens koleszterin analóg (NBD-koleszterin) beépülése a membránba nem volt egyenletes, a konfokális mikroszkópos képek alapján a számított markánsan pozitív Pearson-együtthatók arra utaltak, hogy a fluoreszcens koleszterin analóg preferenciálisan a CTX-B által jelölt lipidtutaj mikrodoménekbe inkorporálódott ($0,234 \pm 0,025$, n=24), elsősorban a Kv1.3 csatornák közelébe ($0,358 \pm 0,023$, n=24) (**14F ábra** és **2. táblázat**). Ezen eredmények a fluorofórral konjugált és natív koleszterin korábban kimutatott hasonló viselkedése alapján arra utalhat, hogy az exogén módon bejuttatott koleszterin elsősorban a tutajokba épül be, azok közül is főleg azon mikrodoménekbe, amelyek Kv1.3 fehérjét tartalmaznak, lehetőséget adva a szterolok és ioncsatornák kölcsönhatására.



14. ábra Szterolok hatása a Kv1.3 és Kv10.1 lipidtutajokba történő partíciójára

A Kv1.3-at, illetve Kv10.1-et kifejező szterollokkal kezelt vagy kontroll HEK-293 sejtekben a csatornák és a lipidtutajok jelölése után konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó régiójáról. A reprezentatív képek a tutajok (A) és a Kv1.3 ioncsatornák (B) jellemző eloszlását mutatják. A két jel kolokalizációja jól látszik az egymásra vetített képeken (C) és a pixelenkénti intenzitások közötti korrelációt mutató kontúr plot ábrán (D). (E) A kolokalizáció mértékét a lipidtutajokat és csatornákat jelző fluorofórok intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs együttható kiszámításával kvantifikáltuk kontroll (fekete), valamint koleszterinnel (piros), illetve 7DHC-val (kék) kezelt sejtekben. Az oszlopdiagramokon az adatokat a kontroll, koleszterinnel, illetve 7DHC-val töltött minták sorrendjében ábrázoltuk. Kísérleteinket

K_v1.3 esetén megismételtük a jelentősen jobb (46-60 nm-es) felbontást biztosító STED mikroszkópia alkalmazásával. A panelen a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltéréseket jelöltük (*, p < 0,05, ANOVA után végzett Tukey's HSD teszt alapján). (F) Konfokális mikroszkópos felvételek elemzésével a panelen jelzett molekula párok között is meghatároztuk a Pearson-együttható értékét 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)metil]amino]-27-norkoleszterin (NBD-koleszterin) töltött sejtekben (n=23-34 sejt).

Jelölés	Kezelés	Átlag ± SEM	Konfidencia intervallum, ha $r=0$		n
GFP-GPI vs. CTX-B	kontroll	0,551 ± 0,020	-0,017	0,039	23
K _v 1.3 _{FLAG} vs. CTX-B	kontroll	0,416 ± 0,013	-0,017	0,036	27
	koleszterin	0,492 ± 0,013	-0,019	0,038	34
	7DHC	0,500 ± 0,015	-0,019	0,035	32
K _v 10.1 _{FLAG} vs. CTX-B	kontroll	0,298 ± 0,019	-0,022	0,036	30
	koleszterin	0,373 ± 0,017	-0,018	0,032	29
	7DHC	0,395 ± 0,018	-0,020	0,039	24
K _v 1.3 _{FLAG} vs. CTX-B (STED)	kontroll	0,274 ± 0,025	-0,006	0,013	25
	koleszterin	0,361 ± 0,019	-0,007	0,011	32
	7DHC	0,366 ± 0,019	-0,009	0,016	28
K _v 1.3 _{FLAG} vs. CTX-B	NBD-koleszterin	0,532 ± 0,038	-0,022	0,045	24
K _v 1.3 _{FLAG} vs. NBD-koleszterin	NBD-koleszterin	0,358 ± 0,023	-0,024	0,040	24
CTX-B vs. NBD-koleszterin	NBD-koleszterin	0,234 ± 0,025	-0,024	0,040	24

2. táblázat A lipidutaj markerek, K_v1.3- vagy K_v10.1-ellenes antitestek, illetve fluorofórral konjugált koleszterin molekulák fluoreszcencia intenzitásai közötti korreláció vizsgálata

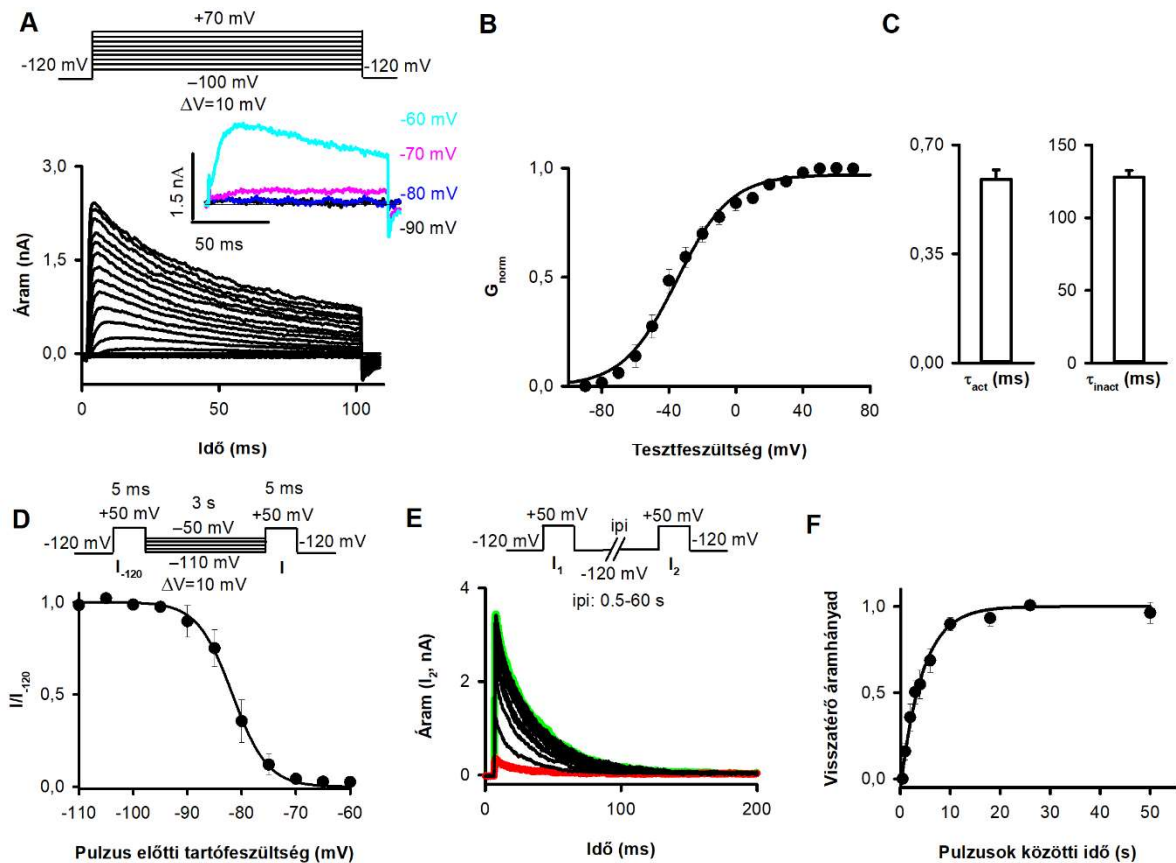
A mérésekhez HEK-293 sejteket transzfektáltunk glükózilfoszfátidilinozitol-horgonyzott zöld fluoreszcens fehérjét (GFP-GPI), illetve K_v1.3_{FLAG} vagy K_v10.1_{FLAG} fehérjét kódoló plazmidokkal, majd jelöltünk AlexaFluor647-CTX-B-vel és anti-FLAG M2-Cy3 antitestekkel vagy AlexaFluor594-CTX-B-vel és anti-FLAG M2 + StarRed-GAMIG antitestekkel. Mikroszkópos képalkotást követően a pixelenkénti intenzitás adatokból kvantitatív képanalízis során meghatároztuk a táblázatban jelölt markerek közötti Pearson-féle korrelációs együtthatók nagyságát. A kiértékelés során csak a sejtmembránnak megfelelő pixelek ("membrán maszk") adatait vettük figyelembe. A táblázat a korrelációs koefficiensek n különböző sejt adataiból számított átlagértékeit (± SEM), valamint a korreláció feltételezett hiánya esetén számított együttható ($r=0$) 95%-os konfidencia intervallumának adatait tartalmazza.

4.6 A kísérleti stratégia bemutatása a *Shaker-IR* T449A/V474C ioncsatornában negatív membránpotenciálokon végbemenő, inaktivációhoz vezető útvonalak tanulmányozásához

A *Shaker-IR* csatornában a 474-es pozíció az S6-os hélixen helyezkedik el, a csatorna nyitott aktivációs kapuja mellett a pórus vízzel telt ürege felé néz¹⁸⁵. Az ebbe a pozícióba helyezett cisztein aminosav csak akkor módosítható Cd^{2+} vagy MTS reagensek által, amennyiben az aktivációs kapu nyitva van^{58,185,186}. Az aktivációs kapu nyitása, azaz a 474C Cd^{2+} általi módosítása az ionáramok mérésével jól nyomonkövethető, ugyanis a bekötődő Cd^{2+} gátolja a depolarizáció során jól és pontosan mérhető ionáramot. Az általunk alkalmazott konstrukt továbbá tartalmazott egy T449A mutációt, ami ismerten felgyorsítja a C-típusú inaktivációt és így lehetővé teszi számunkra annak tanulmányozását^{33,41}.

Az inaktiváció során az aktivációs kapu állapotának monitorozására szolgáló pulzusprotokoll megtervezéséhez először karakterizáltuk a T449A/V474C *Shaker-IR* konstrukt főbb elektrofiziológiai paramétereit patch-clamp technika segítségével, inside-out konfigurációban. Az inside-out konfiguráció alkalmazását ezen kísérleteink során az követelte meg, hogy az inside-out konfigurációban az intracelluláris oldat összetétele az általunk alkalmazott gyorsperfúziós rendszerrel könnyen és gyorsan változtatható ugyanazon mérés alatt, ami lehetővé tette az intracelluláris oldal felől ható, különböző koncentrációjú Cd^{2+} -ot tartalmazó, valamint Cd^{2+} -mentes (kontroll) oldatok cseréit. A részletes protokollokat és kiértékelést az Anyagok és módszerek fejezet 3.6.3. pontja tartalmazza. Először különböző tesztpotenciálokra regisztráltuk az áramokat (**15A ábra**), majd a csúcsáramok és a hajtóerő ($V - E_{\text{ekv}}$) ismeretében az adott membránpotenciálon a csúcs konduktanciát (G), annak normalizálását követően pedig a normált konduktancia-feszültség (**15B ábra**, $G_{\text{norm}}-V$ görbe) összefüggését határoztuk meg. A félaktivációs feszültség ($V_{1/2} = -51,6 \pm 2,5$ mV) és meredekségi együttható ($k = 16,9 \pm 2,1$ mV) meghatározása az egyes sejtek normált konduktanciájának tesztpotenciáltól való függését leíró, adatpontokra illesztett Boltzmann-függvény alapján történt (átlag \pm SEM, $n=5$). A **15B ábrán** feltüntetett $G_{\text{norm}}-V$ görbét az egyes potenciálokra nyert G_{norm} értékek átlagolása (\pm SEM) alapján szerkesztettük. Az aktivációs és inaktivációs időállandók +50 mV-on mért értékeit a **15C ábra** mutatja. Mind az áram aktivációs, mind pedig az inaktivációs kinetikája elég gyorsnak bizonyult ahhoz, hogy a mérések racionális idő alatt elvégezhetőek legyenek, a protokollok időbeli lefutásának tervezésekor ezeket a paramétereket vettük figyelembe. Meghatároztuk továbbá az egyensúlyi inaktiváció (SSI) feszültségfüggését (lásd 3.6.3 fejezet), aminek jellemzéséhez meghatároztuk a nem inaktivált csatornák hányadának (I/I

120) depolarizáló pulzus előtti tartófeszültségtől való függését. Az egyedi sejtekre kapott pontsorokhoz a Boltzmann-függvényt illesztettük, és meghatároztuk a félaktivációs feszültséget ($V_{1/2} = -81,7 \pm 0,7$ mV) és meredekségi együtthatót ($k = -5,8 \pm 0,6$ mV) (\pm SEM, $n=4$). A **15D ábrán** a feltüntetett görbét az egyes tartófeszültségeken mért I/I_{-120} értékek átlagolásával szerkesztettük (\pm SEM, $n=4$). +50 mV-os pulzuspárok alkalmazásával és a pulzusok közötti időintervallumok (ipi) változtatásával (**15E ábra**) meghatároztuk az inaktivációból való visszatérés kinetikáját -120 mV-on, ezt a potenciált később a kísérletek során a pulzusprotokollok közötti tartófeszültségnek használtuk. Ezen a tartófeszültségen az inaktivációból való visszatérés kinetikáját jellemző időállandó $4,4 \pm 0,6$ s-nak adódott ($n=5$) (**15F ábra**).

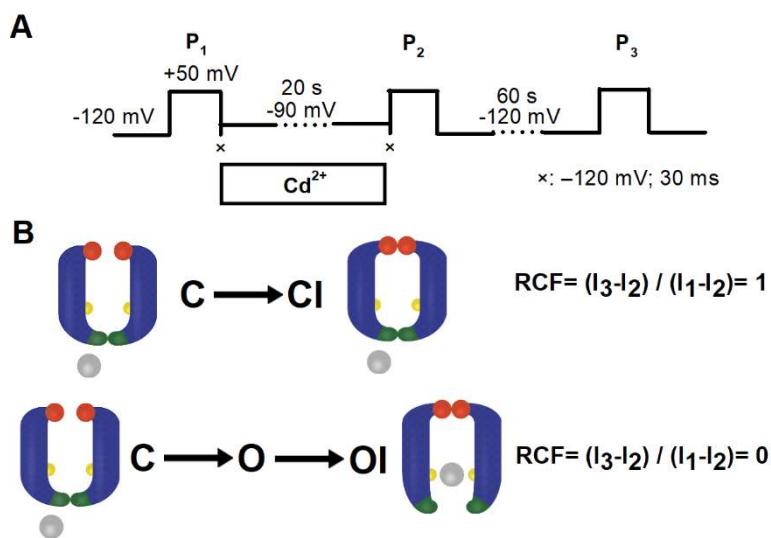


15. ábra HEK-293 sejtekben kifejezett T449A/V474C *Shaker*-IR ioncsatorna elektrofiziológiai paraméterei (A) Az inside-out konfigurációban történő K^+ áramok méréséhez a T449A/V474C *Shaker*-IR ioncsatornát kifejező sejtekből kitépelt patch-eket -120 mV-os tartófeszültségre depolarizáltuk -100 és $+70$ mV közötti tesztfeszültségekre 10 mV-os léptékkel 100 ms hosszan 60 s-onként (lásd pulzusprotokoll a görbék felett). A panelen belüli betét ábra a feltüntetett tesztfeszültségek mellett mutat reprezentatív áramgörbéket jobb felbontásban, a görbék szinkódolása a tesztpotenciálok szinkódolásával egyezik meg. (B) Az $n=5$ sejt adataiból számított G_{norm} értékeket tesztfeszültségenként átlagoltuk és a vonatkozó tesztfeszültség függvényében ábrázoltuk. Az ábrán az átlagolt adatpontokra legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényt folytonos vonallal jelöltük. (C) Az aktivációs időállandó meghatározásához (τ_{act}) 5 ms hosszúságú $+50$ mV-os depolarizáló pulzusokat használtunk -120 mV-os tartófeszültségre kiindulva és a kiváltott áramok görbéit a Hodgkin-Huxley n^4 -modell szerint illesztettük ($n=6$). Az inaktivációs időállandó (τ_{inact}) számítása a 2000 ms hosszúságú $+50$ mV-os pulzusok által

kiváltott áramgörbék leszálló szárára (lásd E panel) illesztett exponenciális csökkenő függvény segítségével történt ($n=5$). **(D)** Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének vizsgálatához a patch-eken a tartófeszültséget 3 s-ra a -120 mV-os tartófeszültségről -110 mV és -50 mV közötti értékekre változtattuk 5 mV-os lépésekben, majd a K^+ áramokat (I) rövid (5 ms-os) $+50$ mV-os teszt pulzus segítségével váltottuk ki. Minden lépés után -120 mV tartófeszültségről indulva egy második teszt pulzust alkalmaztunk (I_{-120}). Minden feszültség mellett $n=4$ mérés adatait átlagolva meghatároztuk a neminaktivált csatornák arányát (I/I_{-120}) és a pulzus előtti potenciál függvényében ábrázoltuk. Az ábrán az átlagolt adatpontokra legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényt folytonos vonallal jelöltük. **(E)** Az inaktivációból való visszatérés kinetikájának mérésére két, egyenként 200 ms-ig tartó $+50$ mV-os depolarizációs pulzust alkalmaztunk -120 mV-os tartófeszültségről indulva. A két impulzus közötti időt (i_{pi}) 0,5 s és 60 s között változtattuk, a második pulzus által kiváltott áram amplitúdója (I_2) jelentősen függött az i_{pi} -től. Az $i_{pi}=0,5$ s (piros), illetve $i_{pi}=60$ s (zöld) mellett nyert áramgörbéket emeltük ki az ábrán. **(F)** A visszatérő áramhányadot az $(I_2 - I_{SS1})/(I_1 - I_{SS1})$ képlet alapján számítottuk, ahol az I_1 az első, míg az I_2 a második pulzus esetén mért csúcáramokat jelöli, az I_{SS1} pedig az egyensúlyi áram nagysága az első depolarizáció végén. A számított visszatérő áramhányad értékeit $n=5$ sejt adataiból átlagoltuk minden i_{pi} esetén és az i_{pi} függvényében ábrázoltuk. Az ábrán az átlagolt adatpontokra legjobban illeszkedő exponenciális függvényt vonallal jelöltük. Az ábrán feltüntetett hibák a SEM értékeit jelölik.

A T449A/V474C csatorna biofizikai paramétereit figyelembe véve terveztük meg a kísérletes stratégiát az állapotfüggő ciszteín modifikációs kísérletekhez, amellyel a zárt állapotból bekövetkező inaktiváció ($C \rightarrow CI$ átmenet) lehetőségét vizsgáltuk. A kísérletekhez a Cd^{2+} -ot az intracelluláris oldal felől alkalmaztuk (**16A ábra**). A protokoll három, egyenként 5 ms hosszúságú $+50$ mV-os depolarizáló pulzust tartalmazott, amelyek a biofizikai karakterizáció alapján teljesen aktiválják a K^+ áramot (**15B ábra**). Az első pulzus (P_1) során kontroll oldat alkalmazása mellett (150 mM K^+ , 0 μ M Cd^{2+}) határoztuk meg az adott inside-out patch-en mérhető maximális K^+ áramot (I_1). Ezt egy 30 ms-os -120 mV-ra történő hiperpolarizáció követte (**16A ábra**, x szimbólum), amelynek hatására az aktivációs kapu bezáródott a Cd^{2+} applikáció előtt. Ezután a membránpotenciált olyan értékre, például -90 mV-ra (**16A ábra**) állítottuk, ahol a csatorna kismértékű egyensúlyi inaktivációt mutat (**15D**), makroszkópos áram viszont nem detektálható (**15A** betét ábra, **15B ábra**). Bár a **15D ábra** alábecsülheti a -90 mV-on mérhető egyensúlyi inaktiváció mértékét a viszonylag rövid (3s) tartási potenciálok miatt, a grafikon jól meghatározza azt a negatív membránpotenciál tartományt, ahol az állapotfüggő ciszteín modifikációs kísérleteket végezhetjük. A -90 mV-on megfigyelhető egyensúlyi inaktiváció mértékét a második depolarizációs pulzus (P_2) által kiváltott áram (I_2) alapján határoztuk meg az I_2/I_1 hányados alapján, az inaktiválódó áramhányadot (IF) pedig $IF = 1 - (I_2/I_1)$ alapján. A 20 s hosszúságú pulzus alatt 20 μ M vagy 200 μ M Cd^{2+} -ot tartalmazó intracelluláris oldatot perfundáltunk a patch-ek citoszolikus felszínére. A patch-ek Cd^{2+} expozíciója közvetlenül a P_1 után kezdődött és a -90 mV-os tartófeszültséget alkalmazó lépés befejezésével, a P_2 előtt ért véget. A P_2 -t megelőzte egy 30 ms hosszúságú lépés -120 mV-ra, hogy elkerüljük a P_2 elején a nyitott állapotú csatornák Cd^{2+} -expozícióját (elektromechanikus késleltetés a perfúziós rendszerben, lásd ⁵⁸, **16A ábra** x szimbólum). P_2 -t

követően a patch-et -120 mV-on tartottuk 60 s-ig, amely elegendő volt ahhoz, hogy kontroll körülmények között biztosítsa az inaktívált csatornák inaktívációból történő teljes visszatérését. Ezt követte a harmadik 5 ms hosszúságú depolarizációs pulzus (P_3), amelynek felhasználásával számoltuk a visszatért áramhányadot az $RCF = (I_3 - I_2) / (I_1 - I_2)$ képlet alapján (**16B ábra**), amelyben az I_1 , I_2 és I_3 rendre a három szekvenciális pulzus által kiváltott és aspecifikus szivárgó árammal korrigált amplitúdókat jelöli. Amennyiben az inaktíváció $C \rightarrow CI$ átmenettel jön létre, vagyis az aktivációs kapu nem nyílik ki inaktíváció előtt, az RCF elméletileg várható értéke 1, mert az aktivációs kapu zárt állapota megakadályozza a 474C Cd^{2+} általi modifikációját és az áram csökkenését (**15B ábra**, felső modell). Ezzel szemben, ha az aktivációs kapu nyitása megelőzi az inaktívációt, a Cd^{2+} módosítja a 474C-t és áramcsökkenés látható. Ha az egyensúlyi inaktívációban részt vevő összes csatorna aktivációs kapuja nyitott -90 mV-on és a Cd^{2+} módosítja az összes ilyen csatornát, az RCF értéke 0 (**15B ábra**, alsó modell). $0 < RCF < 1$ azt mutatja, hogy egyensúlyi inaktíváció során a csatornák a Cd^{2+} számára elérhető állapotban voltak (további magyarázat a Diskusszió 5.10-es pontjában).

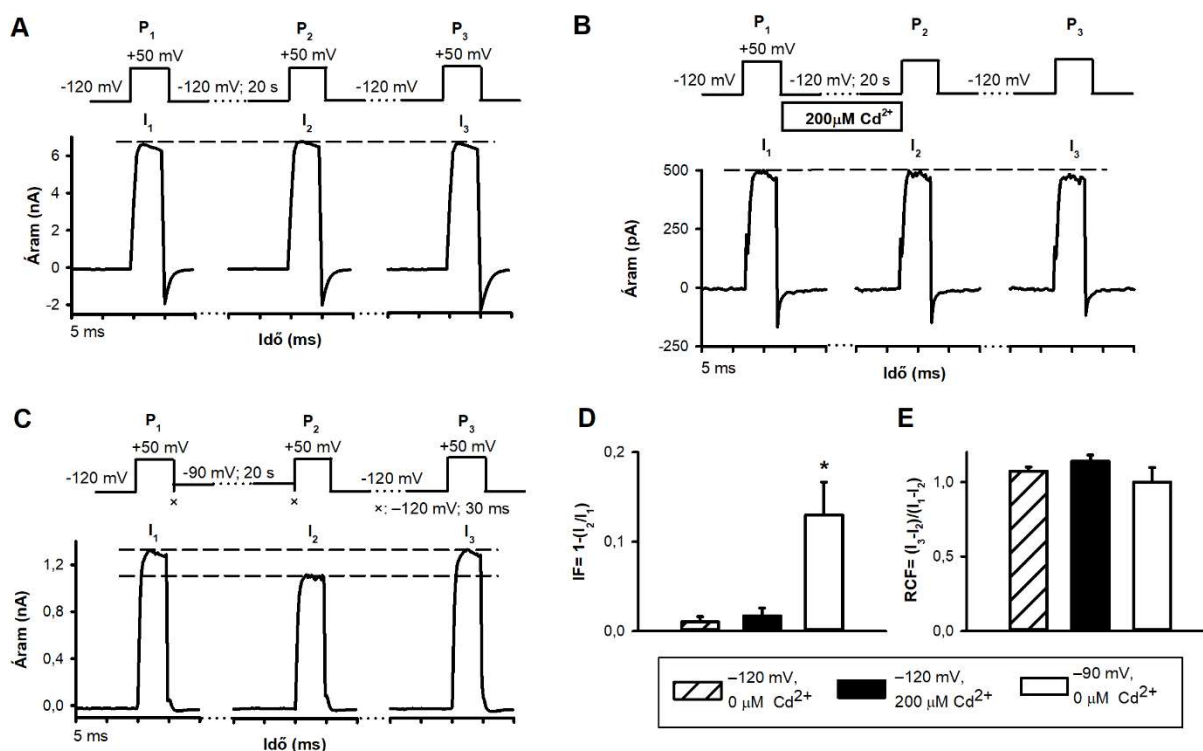


16. ábra A T449A/V474C Shaker-IR ioncsatornában a zárt állapotú inaktíváció vizsgálatára alkalmazott kísérletes stratégia leírása

(A) A pulzusprotokoll három, egyenként 5 ms hosszúságú $+50$ mV-ra történő depolarizációból állt (P_1 , P_2 és P_3), a pulzusok által kiváltott csúcsáramokat a B panelen I_1 , I_2 és I_3 jelöli. A P_1 és P_2 között az inside-out patch-eket Cd^{2+} -ot tartalmazó intracelluláris oldattal perfundáltuk -90 mV-os tartófeszültségen 20 s-ig. A nyitott állapotú csatornák P_1 és P_2 alatti Cd^{2+} expozíciójának elkerülésére egy 30 ms hosszúságú -120 mV-os lépést alkalmaztunk közvetlenül a P_1 után és a P_2 előtt, amelyet az ábrán „x” szimbólum jelez. A P_2 és P_3 között a patch-eket -120 mV-os tartófeszültségen tartottuk 60 s-ig. (B) Az aktivációs (S6 hélixek intracelluláris része, sötétzöld színnel) és C-típusú inaktívációs kapuk (piros gömbök) között elhelyezkedő, 474-es pozícióban található ciszteinek (sárga gömbök) módosíthatóságát az inaktíváció során intracelluláris oldalról alkalmazott Cd^{2+} (szürke gömbök) segítségével határoztuk meg. A Cd^{2+} ugyanis a 474C-hez való kötődés eredményeképpen gátolja a K^+ áramot, ezáltal az aktivációs kapu esetleges nyitása pontosan nyomomonkövethetővé válik az ionáramok mérésével a C-típusú inaktíváció kifejlődése során. Az RCF (visszatért áram aránya) értékének modell szerinti előrejelzése a szövegben található, míg az I_1 , I_2 és I_3 paraméterek definíciója az A panelben szerepel.

4.7 Az aktivációs kapu nyitása megfigyelhető a *Shaker-IR T449A/V474C* ioncsatornában negatív membránpotenciálok mellett

Három különböző kontroll kísérletben vizsgáltuk, hogy az előző fejezetben bemutatott hárompulszusos protokollunk képes-e specifikusan az aktivációs kapu nyitását jelezni. Az első kísérlet során a P_1 és P_2 között 20 s-ig -120 mV-os tartófeszültség mellett Cd^{2+} hiányában az I_2 nem csökkent az I_1 -hez képest (**17A ábra**). Inaktiváció nem volt megfigyelhető ($IF \sim 0$) és ezzel összhangban az RCF értéke 1-hez közelinek adódott (**17D, E ábrák** csíkozott oszlopok). Ebből arra következtettünk, hogy a hárompulszusos protokollban -120 mV mellett elkerültük az egyensúlyi inaktiváció kialakulását ($I_2=I_1$), a pulzusok időtartama és az azok között eltelt idő elegendő ahhoz, hogy az I_1 és I_3 azonos legyen, amikor nincs inaktiváció ($RCF \sim 1$, **17E**). A második kontroll mérés során P_1 és P_2 között -120 mV-os tartófeszültségen a csatornák intracelluláris felszínét $200 \mu M Cd^{2+}$ tartalmú oldattal perfundáltuk. Mivel ekkor nem csökkent sem az I_2 (azaz $IF \sim 0$, **17B, D ábrák**), sem az I_3 ($RCF \sim 1$, **17B, E ábrák**), arra következtettünk, hogy egyrészt a Cd^{2+} expozíciónak nincs aspecifikus hatása, ha az aktivációs kapu nem nyílik ki (**17B ábra**), másrészt a Cd^{2+} perfúzió megfelelően kontrollált, ezáltal a protokoll során a Cd^{2+} applikáció kezdete és vége optimális ahhoz, hogy a nyitott csatornák elkerüljék a Cd^{2+} expozíciót, amikor zárnak (a P_1 végén), illetve amikor a zárt csatornák nyílnak (a P_2 alatt). A harmadik kontroll kísérlet azt mutatja, hogy Cd^{2+} hiányában a P_1 és P_2 között a -90 mV-os tartófeszültség által inaktiválódott összes csatorna (**17D ábra**, üres oszlopok, IF szignifikáns növekedése, $p < 0,05$) visszatér az inaktivációból (**17C ábra**, valamint **17E ábra**, üres oszlopok, $RCF \sim 1$).

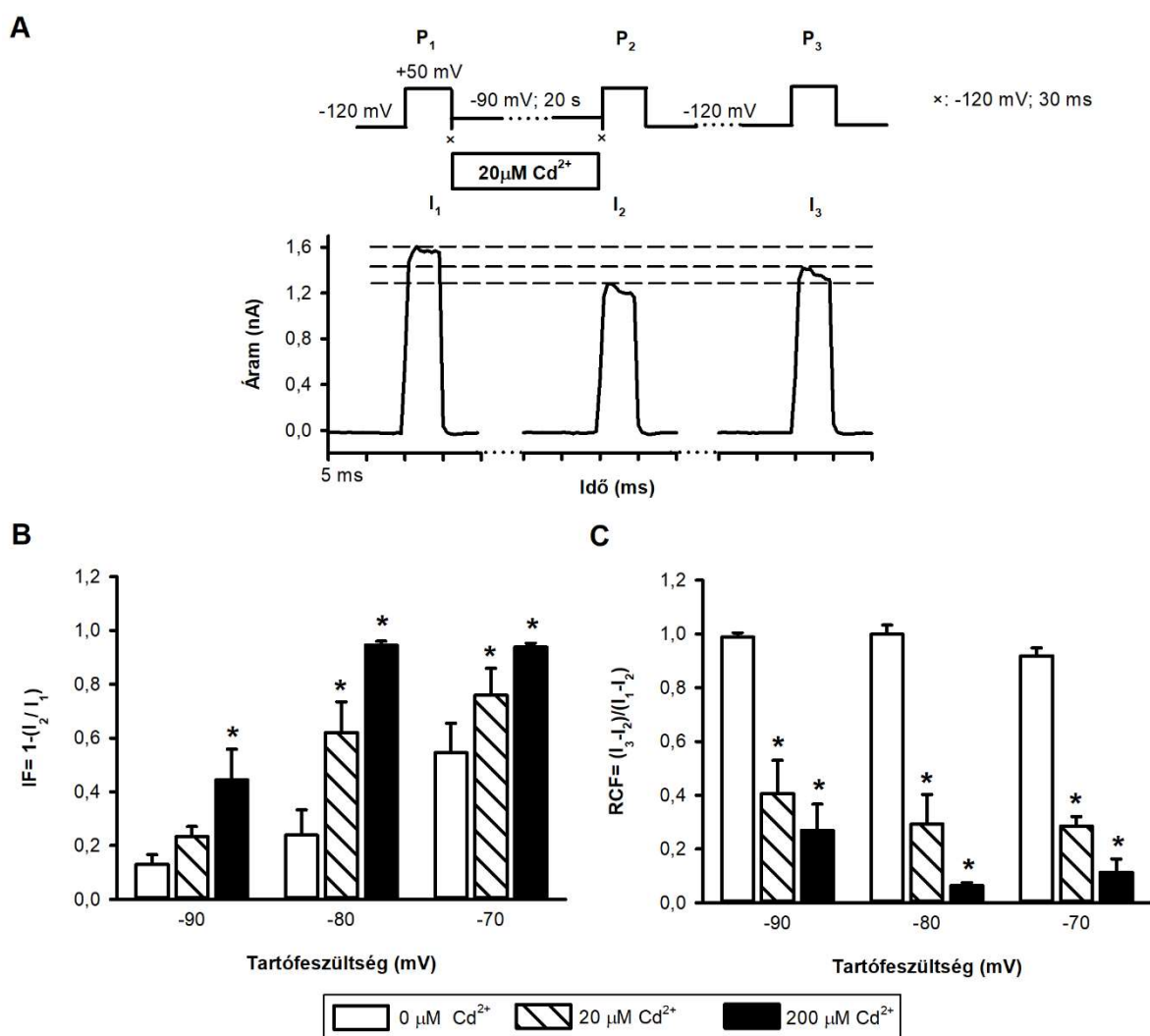


17. ábra A hárompulzusos protokoll, kontroll mérések

A kontroll mérések elvégzéséhez három különböző kísérleti helyzetet vizsgáltunk T449A/V474C *Shaker*-IR csatornákat kifejező HEK-293 sejtekben inside-out patch konfigurációban. Az **A**, **B** és **C** paneleken a reprezentatív áramgörbék a három +50 mV-ra történő depolarizációs pulzus (P₁, P₂ és P₃) által kiváltott áramokat mutatják –120 mV-os tartófeszültségről indulva. Az **A** panelen a P₁ és P₂ között –120 mV-on Cd²⁺ hiányában, a **B** panelen –120 mV-on 200 μM Cd²⁺ jelenlétében, a **C** panelen –90 mV-on Cd²⁺ hiányában tartottuk az inside-out patch-eket. A protokollok többi része mindhárom esetben azonos volt. A szaggatott referencia vonalak az I₁ értékét jelzik. **(D)** Az egyes oszlopok az inaktíválódott csatornák arányát mutatják (IF= 1–I₂/I₁) a P₁ és P₂ közötti –120 mV-os tartófeszültségen (csíkozott oszlop), –120 mV-on 200 μM Cd²⁺ jelenlétében (tele oszlop) és –90 mV-on Cd²⁺ hiányában (üres oszlop). **(E)** Az oszlopok az inaktivációból visszatért áram arányát (RCF=(I₃–I₂)/(I₁–I₂)) mutatják a P₁ és P₂ közötti –120 mV-os tartófeszültségen (csíkozott oszlop), a P₁ és P₂ közötti –120 mV-os tartófeszültségen 200 μM Cd²⁺ jelenlétében (tele oszlop) és a P₁ és P₂ közötti –90 mV-os tartófeszültségen Cd²⁺ hiányában (üres oszlop). Az ábrán az adatok átlagát ± SEM (n=5) ábrázoltuk. A kontrollhoz (–120 mV Cd²⁺ nélkül) viszonyított eltéréseket szignifikánsnak tekintettük (*), amennyiben p<0,05.

Az RCF különböző negatív tartófeszültségtől való függésének vizsgálatához –90, –80 vagy –70 mV-os tartófeszültségeket alkalmaztunk a P₁ és P₂ között 20 μM vagy 200 μM intracelluláris Cd²⁺ jelenlétében. A **18A ábrán** 20 μM Cd²⁺ és –90 mV tartófeszültség esetén elvégzett kísérlet során mért reprezentatív áramgörbék láthatók. Jóllehet makroszkópos áram nem mérhető –90 mV-on (**15A, B ábrák**), kismértékű egyensúlyi inaktiváció megjelenik (**IF, 17D ábra**, üres oszlop). –80 és –70 mV tesztpotenciálokon teljessejt-áram már mérhető (**15A** betét ábra) és ezzel párhuzamosan az inaktiváció egyre prominensebbé válik (**15D ábra**). Ennek megfelelően, ahogy azt a **18B ábra** mutatja, az IF értéke szignifikáns mértékben nőtt –90 mV-os tartófeszültségen 200 μM Cd²⁺ alkalmazása esetén, valamint –80 és –70 mV-os tartófeszültségek mellett mind 20, mind 200 Cd²⁺ jelenlétében az ugyanazon

membránpotenciálokon mért Cd^{2+} mentes körülményekhez képest. A **18C ábrán** bemutatott adatok azt mutatják, hogy az RCF adott tartófeszültség mellett szignifikáns mértékben csökkent, ha Cd^{2+} volt jelen a P_1 és P_2 közötti tartófeszültség alatt összevetve a Cd^{2+} mentes mérések során kapott adatokkal (**18C ábra**). Ez azt mutatja, hogy az aktivációs kapu nyitása a -90 és -70 mV közötti potenciáltartományban megtörténik. Ennek megfelelően a Cd^{2+} -90 mV-on módosítja a 474-es pozícióban levő ciszteint makroszkóposan megfigyelhető áram hiányában is (**15A** betét ábra). Az RCF szignifikánsan csökkent $20 \mu\text{M}$ és $200 \mu\text{M}$ Cd^{2+} jelenlétében (**18C ábra**, csíkozott és tele oszlopok) minden tartófeszültségen. Cd^{2+} hiányában az RCF értékei gyakorlatilag megegyeznek minden tartófeszültség esetén (**18C ábra**, üres oszlopok).

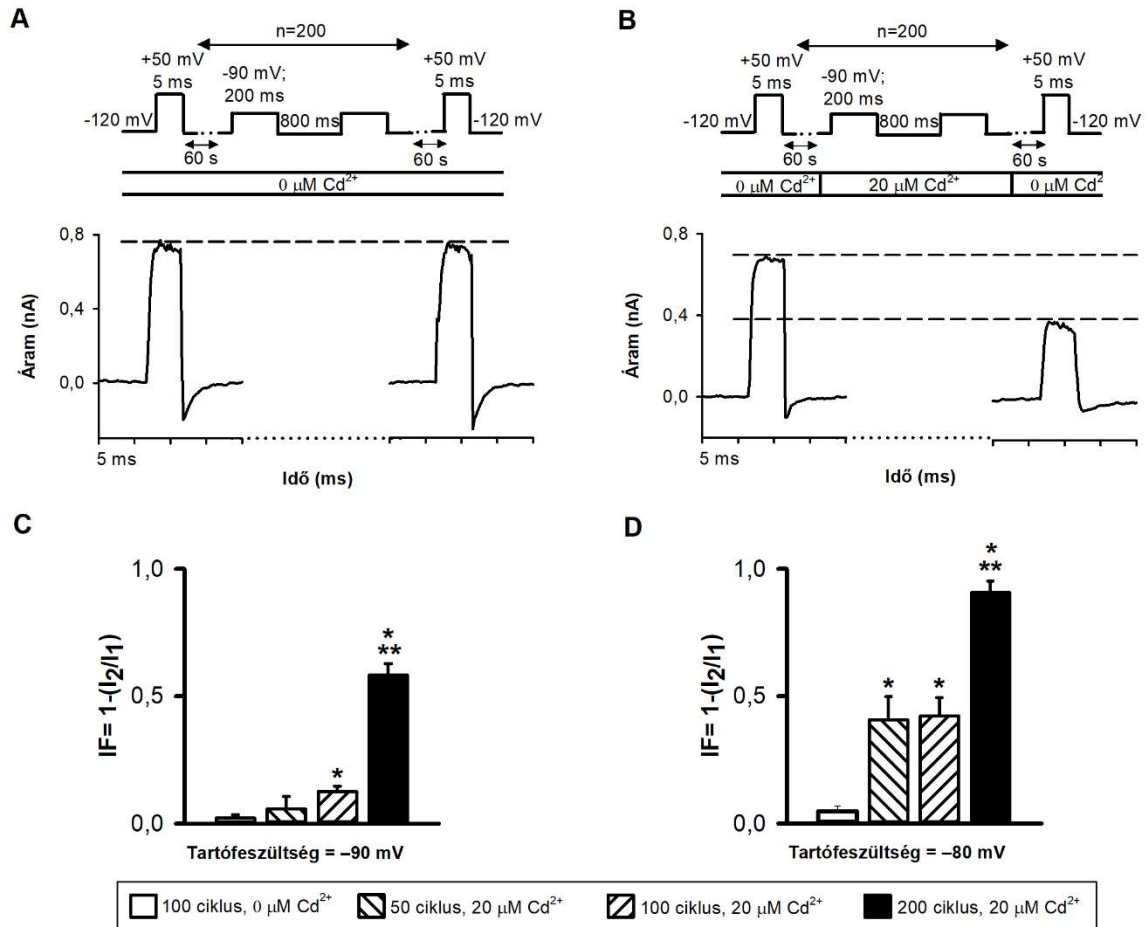


18. ábra Az inaktiválódott áram arányának (IF) és a visszatért áram arányának (RCF) meghatározása intracellulárisan alkalmazott Cd^{2+} segítségével

(A) A T449A/V474C csatornákat kifejező inside-out patch-et $20 \mu\text{M}$ Cd^{2+} jelenlétében tartottuk a P_1 és P_2 között -90 mV-os tartófeszültség mellett (panel felső része, a kísérleti stratégiát lásd a 16. ábrán). A P_3 előtt a tartófeszültség -120 mV volt. Az "x" szimbólum a 30 ms hosszúságú -120 mV-os pulzust jelöli. Az ábrán a

szaggatott referenciavonalak az I_1 , I_2 és I_3 értékeit jelölik. **(B)** Minden pulzus esetén a csúcsáramok értékeiből kiszámoltuk az inaktíválódott áram arányát ($IF = 1 - (I_2/I_1)$) a jelölt tartófeszültségek esetén először Cd^{2+} hiányában (üres oszlopok), majd $20 \mu M$ (csíkozott oszlopok), illetve $200 \mu M Cd^{2+}$ (tele oszlopok) jelenlétében. **(C)** Meghatároztuk a visszatért áram arányát ($RCF = (I_3 - I_2)/(I_1 - I_2)$) a P_1 és P_2 között alkalmazott -90 , -80 , vagy -70 mV-os tartófeszültségek esetén Cd^{2+} expozíció hiányában (üres oszlopok), illetve $20 \mu M$ (csíkozott oszlopok) vagy $200 \mu M Cd^{2+}$ (tele oszlopok) jelenlétében. Az ábrán az adatok átlagát \pm SEM ($n=5$) ábrázoltuk. A kontrollhoz (az adott tartófeszültség mellett a $0 \mu M Cd^{2+}$ -ot tartalmazó adatok) viszonyított eltéréseket szignifikánsnak tekintettük (*), amennyiben $p < 0,05$.

Ezt követően azt mutattuk meg, hogy hasonló áramvesztést tudunk elérni akkor is, ha rövid ideig sokszor alkalmazzuk a Cd^{2+} -ot. Ehhez több cikluson keresztül, -90 vagy -80 mV-os tartófeszültségeken 200 ms-ig $20 \mu M Cd^{2+}$ -ot tartalmazó oldatot áramoltattunk az inside-out patch-ekre (**19. ábra**). A kísérletes protokoll ezekben az estekben (**19A, B ábrák**) egy 5 ms hosszúságú $+50$ mV-os depolarizációval kezdődött, ami alapján egy I_1 amplitúdóval rendelkező csúcsáramot határoztunk meg, majd ezt követően -120 mV-os tartófeszültséget alkalmaztunk 60 s-on keresztül. Ezután következett a ciklus egy egysége, amely egyrészt egy 200 ms-os -90 mV-os (vagy -80 mV-os) pulzusból, illetve egy 800 ms-os -120 mV-os pulzusból állt. Ezt ismételtük meg $n=200$ vagy 50 , vagy 100 alkalommal. A ciklusok után egy 60 s-ig tartó -120 mV-os tartófeszültség következett Cd^{2+} hiányában, végül a szekvenciát egy 5 ms-os $+50$ mV-ra történő depolarizáció zárta le, ami alapján meghatároztuk az I_2 -t. A méréseket Cd^{2+} hiányában (**19A ábra**) vagy $20 \mu M$ intracelluláris Cd^{2+} jelenlétében (**19B ábra**) végeztük az ábrán jelölt ciklusszám mellett. A Cd^{2+} által módosított csatornák kumulált hányadát az $IF = 1 - I_2/I_1$ szerint határoztuk meg, a korábban leírtakhoz hasonlóan. Amint azt a **19C** és **19D ábrák** mutatják, a $474C$ kumulált Cd^{2+} expozíciója által történő módosítása idő- és feszültségfüggő. -80 mV alkalmazása mellett a modifikáció jelentősebb mértékű és az IF értéke jobban növekszik, mint -90 mV esetén. A pulzusszekvencia során a kumulált Cd^{2+} expozíció 100 -as ciklusszám mellett hasonló, mint $20 \mu M Cd^{2+}$ egyszeri 20 s-os alkalmazása esetén.



19. ábra A T449A/V474C csatornák Cd^{2+} általi módosítása függ a membránpotenciál nagyságától és az alkalmazás időtartamától

(A) A kumulált Cd^{2+} expozíció hatásának mérésére a pulzusszekvencia során kontroll esetben a ciklus egy egysége egy 200 ms hosszúságú -90 mV-os és egy 800 ms hosszúságú -120 mV-os pulzust tartalmazott, amelyet $n=200$ alkalommal ismételtünk. A ciklusok elején és végén 5 ms hosszúságú $+50$ mV-os pulzust alkalmaztunk, így a vizsgált inside-out patch ciklus előtti (I_1) és ciklus utáni (I_2) csúcstartományait határoztuk meg. Az első $+50$ mV-os pulzus után, valamint a második $+50$ mV-os pulzus előtt 60 s-on keresztül -120 mV-os tartófeszültséget alkalmaztunk. A szaggatott referenciavonal az I_1 értékét jelöli. (B) Kumulált Cd^{2+} expozíció esetén a ciklus felépítése ugyanolyan volt, mint a kontroll esetekben, azzal a különbséggel, hogy $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ volt jelen az oszloppal jelzett időtartamnak megfelelően. A ciklus egy egységét szintén $n=200$ -szor ismételtük. Az ábrán a szaggatott referenciavonalak az I_1 és I_2 értékeit jelölik. (C) -90 mV mellett (amelyet a ciklus egy egységének 200 ms-os szegmensében alkalmaztunk) meghatároztuk az $1 - I_2/I_1$ értéket különböző ciklusszám mellett Cd^{2+} hiányában (üres oszlop, ciklusszám $n=50$), illetve $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ jelenlétében $n=50$ (bal oldali csíkozott oszlop), $n=100$ (jobb oldali csíkozott oszlop), $n=200$ (tele oszlop) ciklusszám mellett. (D) A C-ben ismertetett méréseket elvégeztük úgy, hogy a ciklus 200 ms-os szegmensében a tartófeszültség -80 mV volt. Az ábrán $n=3-7$ független mérés átlagait \pm SEM tüntettük fel. A kontrollhoz viszonyított eltéréseket szignifikánsnak tekintettük (*), amennyiben $p < 0,05$. A (**) jelölés azokat a mintákat jelzi, amelyek a kontroll mellett minden egyéb mintától szignifikáns mértékben különböztek ($p < 0,05$).

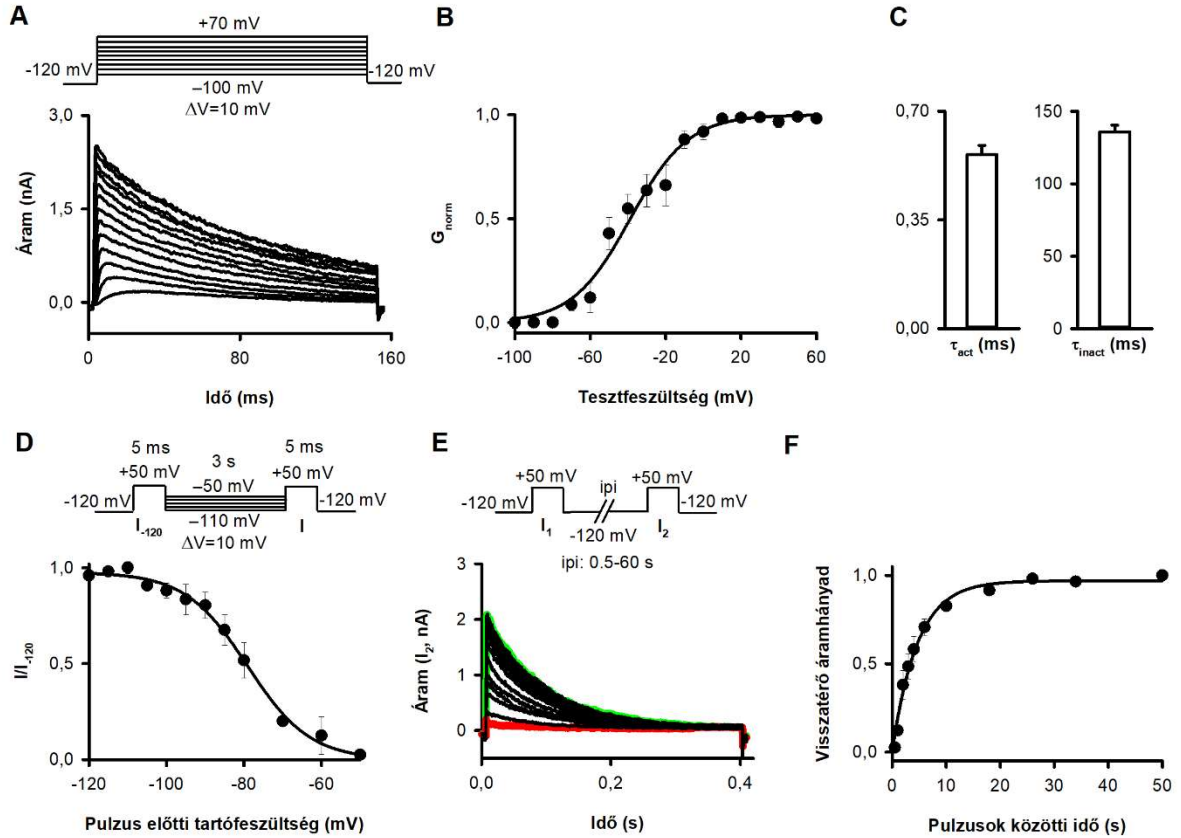
Eredményeink összességében azt mutatják, hogy azokon a tartófeszültségeken, ahol jelentős mértékű egyensúlyi inaktiváció megy végbe (-90 , -80 , -70 mV), az aktivációs kapu megfigyelhető áram hiányában is kinyílik. Ez a megfigyelés arra utal, hogy negatív membránpotenciálok mellett a csatornák a $\text{C} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{OI}$ útvonalon kerülnek CI állapotba, nem

pedig a sokak által javasolt közvetlen C→CI átmeneten keresztül²⁰⁰⁻²⁰³ (további magyarázat a Diskusszó 5.10-es fejezetében).

4.8 A nyitott állapotban rögzített aktivációs kapu megakadályozza a *Shaker-IR* T449A/V476C csatornák C-típusú inaktivációból történő visszatérését

A fenti kísérletek eredményei arra utalnak, hogy negatív tartófeszültségek esetén az inaktiváció bekövetkezéséhez fontos az aktivációs kapu nyitása. A csatornák inaktivációból való visszatérésének képessége szintén függhet az aktivációs kapu konformációs állapotától, mozgásától. Az aktivációs kapu nyitott állapotban történő rögzítése ezáltal alkalmas módszer az inaktivációból való visszatérést meghatározó tényezők vizsgálatára.

Korábbi megfigyelések alapján a *Shaker-IR* 476C mutáns csatorna aktivációs kapuja nyitott állapotban rögzíthető az intracelluláris oldal felől alkalmazott Cd²⁺ segítségével²³. Ennek háttérében az egyik alegység 476C és egy szomszédos alegység natív H486 aminosavai között kialakuló Cd²⁺-híd áll, amely gátolja a csatorna aktivációs kapujának zárását még negatív potenciálok esetén is. A HEK-293 sejtekben kifejezett T449A/V476C *Shaker-IR* csatorna inside-out patch-clamp konfigurációban végzett biofizikai karakterizálását ebben az esetben is elvégeztük a kísérletek során alkalmazott pulzusprotokollok tervezése előtt. A karakterizáció során a 474C mutánssal megegyező protokollokat, illetve azonos kiértékelési módszert használtunk (**20. ábra**).



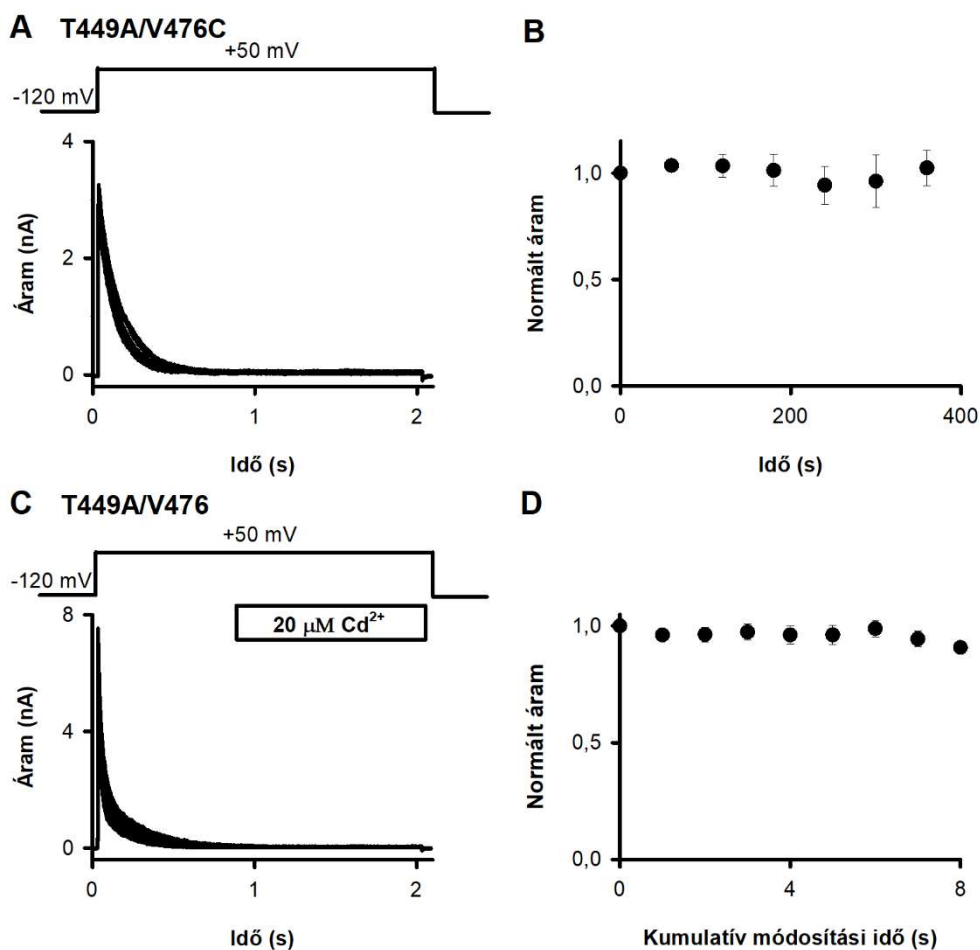
20. ábra T449A/V476C Shaker-IR csatorna biofizikai karakterizációja

(A) A T449A/V476C mutáns csatornák egyensúlyi aktivációjának karakterizálásához az inside-out konfigurációjú patch-eket -120 mV-on tartottuk, majd -100 és $+70$ mV közötti tesztpotenciálokra depolarizáltuk 10 mV-os lépésközökkel 60 s-onként. A depolarizáló pulzusok időtartama 100 ms volt (mint a korábban leírt protokoll esetén). Az A panelen egy, a mérések során nyert reprezentatív áramgörbe látható. (B) A G - V adatpontokat a $G = I_{\text{peak}} / (V - E_{\text{ekv}})$ képlet alapján határoztuk meg, ahol I_{peak} az adott V tesztpotenciál esetén nyert csúcáram nagysága, E_{ekv} pedig a K^+ egyensúlyi potenciálja. A számított G értékeket a maximális konduktancia értékére normáltuk (G_{norm}) és a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk. Az adatok kiértékelése során a Boltzmann-függvényt $n=5$ patch G_{norm} - V adatpárjaira illesztettük (3.6.3.1 egyenlet). A sejtenként illesztett paraméterek átlagolásából $V_{1/2} = -38,8 \pm 2,1$ mV, valamint $k = 15,3 \pm 1,8$ mV értékeket kaptunk ($n=5$, átlag \pm SEM). Az ábrán $n=5$ sejt adataiból nyert G_{norm} - V értékek átlagait ábrázoltuk a tesztpotenciál függvényében (\pm SEM), a folytonos vonal a legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényt mutatja. (C) Az aktivációs időállandó (τ_{act}) meghatározásához -120 mV-os tartófeszültségről indulva 5 ms hosszúságú $+50$ mV-os depolarizáló pulzusokat alkalmaztunk. Az áramgörbéket a Hodgkin-Huxley n^4 -modell alapján illesztettük (3.6.3.3 egyenlet), az aktivációs kinetika jellemzésére a τ_{act} értékeket használtuk. A $+50$ mV-on kapott áram inaktivációs időállandójának (τ_{inact}) meghatározásához a 2000 ms hosszúságú depolarizáló pulzus által kiváltott áram csökkenő fázisára egy exponenciális tagot tartalmazó függvényt illesztettünk (3.6.3.2 egyenlet). (D) Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének leírására az eredeti -120 mV-os tartófeszültségről indulva a pulzus előtti potenciált -110 és -50 mV közötti értékekre állítottuk be ($\Delta V = 5$ mV) 3 s-on keresztül, majd egy 5 ms hosszúságú $+50$ mV-os teszt pulzust alkalmaztunk a K^+ áramok kiváltására (lásd protokollt a panel felső részén). A nem inaktiválódó csatornák hányadát minden feszültség esetén az I/I_{-120} képlettel számítottuk, amelyben I a pulzus előtti potenciálról 5 ms hosszúságú $+50$ mV-os depolarizáció által kiváltott csúcáram nagysága, míg I_{-120} a -120 mV-os tartófeszültségről az azonos depolarizáció által kiváltott csúcáram nagysága. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését jellemző adatokhoz a Boltzmann-függvényt illesztettük. A sejtenként illesztett paraméterek átlagolásából nyert paraméterek $V_{1/2} = -79,1 \pm 0,7$ mV-nak, valamint $k = -8,0 \pm 0,6$ mV-nak adódtak ($n=5$, átlag \pm SEM). Az ábra $n=5$ sejt adataiból a különböző pulzus előtti tartófeszültségek mellett nyert I/I_{-120} átlagértékeket (\pm SEM) ábrázoltuk, a folytonos vonal a legjobban illeszkedő Boltzmann-függvényt mutatja. (E) Az inaktivációból való visszatérés kinetikájának méréséhez 200 ms hosszúságú $+50$ mV-os pulzuspárokat alkalmaztunk -120 mV-os tartófeszültségről kiindulva (lásd protokollt a panel felső részén). A két impulzus közötti időt (i_{pi}) $0,5$ s és 60 s között változtattuk, a második pulzus által kiváltott áram

amplitúdója (I_2) jelentősen függött az i_{pi} -től. Az $i_{pi}=0,5$ s (piros), illetve $i_{pi}=60$ s (zöld) mellett nyert áramgörbéket emeltük ki az ábrán. **(F)** A visszatérési hányadot az $(I_2 - I_{SS1}) / (I_1 - I_{SS1})$ képlet alapján számítottuk, ahol I_2 és I_1 rendre a második és első pulzus során kiváltott csúcsáramok nagysága, míg I_{SS1} az első depolarizáció végén mért egyensúlyi áram nagysága. A számított visszatérő áramhányad értékeit $n=5$ sejt adataiból átlagoltuk (\pm SEM) minden i_{pi} esetén és az i_{pi} függvényében ábrázoltuk. Az inaktivációból való visszatérés időállandójának (τ_{rec}) meghatározásához az adatpontokra egykomponensű, elsőfokú, telítésbe futó exponenciálisan emelkedő függvényt illesztettünk (3.6.3.5 egyenlet). A $\tau_{rec} = 4,6 \pm 0,6$ s-nak adódott ($n=3$).

A biofizikai karakterizáció során kapott eredmények alapján megterveztük azt a kísérleti protokollt, amivel később az aktivációs kapu nyitott állapotban történő rögzítésének hatását vizsgáltuk a csatornák inaktivációból való visszatérésére. A protokollt először kontroll körülmények között teszteltük. T449A/V476C csatornában az inaktivációból való visszatérés mértékét -120 mV tartófeszültségről induló, 2 s hosszúságú, $+50$ mV-os, egymás után ismétlődő depolarizáló impulzusok által kiváltott áramok amplitúdójának mérésével határoztuk meg. A pulzusok közötti időintervallum (i_{pi}) 60 s volt (**21A ábra**). Az áramokat normáltuk az első pulzus által kiváltott csúcsáramra és az első depolarizáló pulzus kezdetétől számított idő függvényében ábrázoltuk (**21B ábra**). Cd^{2+} hiányában az ismételt depolarizációk által kiváltott áramok amplitúdója hasonló volt T449A/V476C csatornák esetén, így az általunk használt i_{pi} hossza kontroll körülmények között elégséges az áram inaktivációból történő teljes visszatéréséhez.

A **21C** és **21D ábrákon** bemutatott második kontroll kísérlet alapján 476C hiányában az intracellulárisan alkalmazott Cd^{2+} nem okoz csökkenést a csúcsáram nagyságában, nem okoz pórusblokkot. A mérések során a pulzusprotokoll ugyanolyan volt, mint a **21A ábrán** ismertetett esetben, kivéve, hogy a patch citoszolikus felszínére (inside-out konfiguráció) $20 \mu M$ Cd^{2+} -ot tartalmazó oldatot áramoltattunk 1 s-on keresztül. A **21C ábrán** jól látható, hogy az áram inaktivációja teljes a Cd^{2+} perfúzió kezdetén, a depolarizált membrán miatt viszont az aktivációs kapu nyitva van, ezért a Cd^{2+} alkalmazása az OI kapuzási állapotban lévő csatornákon történik (**2. ábra**). A T449A/V476C csatornában azonos csúcsáramokat tapasztaltunk még hosszú (akár 8 s-ig terjedő) kumulált Cd^{2+} expozíció mellett is (**21D ábra**), ami arra utal, hogy a Cd^{2+} nem befolyásolja az áramok nagyságát 476C hiányában.

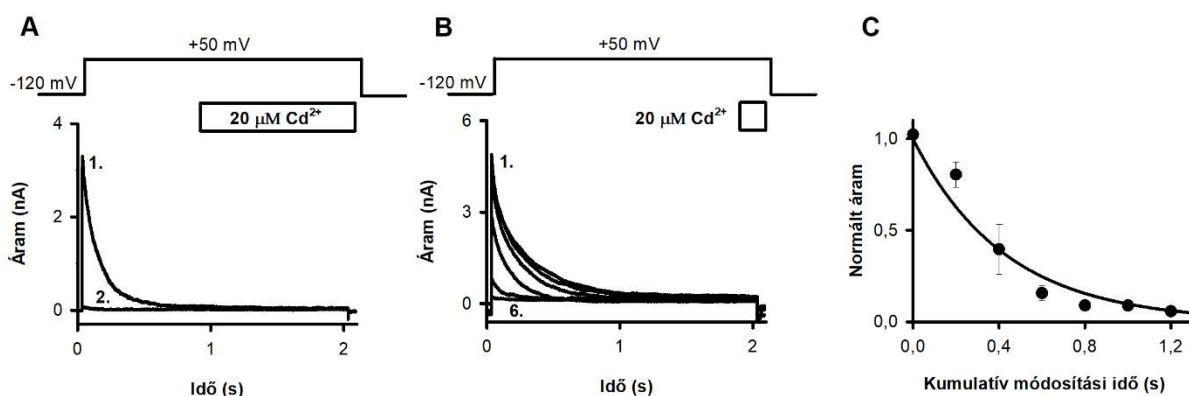


21. ábra Kontroll mérések az OI→O átmenet vizsgálatához

(A) Az ábrán bemutatott, egymásra vetített áramgörbék méréséhez egy T449A/V476C *Shaker*-IR csatornákat kifejező HEK-293 sejtől húzott inside-out patch-et -120 mV-os tartófeszültségről ismétlődően depolarizáltunk $+50$ mV-ra 2 s-on keresztül a panel felső részén bemutatott pulzusprotokoll szerint. A pulzusok közti idő (ipi) 60 s volt. (B) Minden pulzus esetén meghatároztuk a csúcsáram nagyságát és normáltuk az első pulzus csúcsáramára, majd az így kapott értékeket ábráztuk az első depolarizáló pulzus kezdetétől eltelt idő függvényében. (C) T449A/V476 (cisztein mutáció nélküli) csatorna esetén szintén az A panelen bemutatott protokollt használtuk, annyi eltéréssel, hogy intracellulárisan $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ -ot tartalmazó oldatot alkalmaztunk inside-out patch konfigurációban. A Cd^{2+} applikáció kezdetét (1 s-mal a $+50$ mV-os depolarizáció után a csatornák teljesen inaktív állapotában) és időtartamát (1 s) az ábrán a vízszintes oszlop jelzi. (D) Minden pulzus esetén meghatároztuk a csúcsáram nagyságát és normáltuk az első pulzus csúcsáramára és az így kapott értékeket ábráztuk a kumulált Cd^{2+} expozíciós idő függvényében. Az ábrán feltüntetett hibásávok a SEM értéket jelzik, $n=5$.

A C-típusú inaktivációból való visszatérésnek az aktivációs kapu állapotától való függésének meghatározására a T449A/V476C *Shaker*-IR csatornák aktivációs kapuját nyitott állapotban rögzítettük $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ -ot tartalmazó oldat intracelluláris alkalmazása segítségével a $+50$ mV-os depolarizáció során, az áram teljes inaktivációját követően (azaz az OI állapotban) (22A, B ábrák). Először megismételtük a 21C ábrán bemutatott kontroll kísérletet, ezúttal a T449A/V476C *Shaker*-IR csatornán. A Cd^{2+} expozíció a 2 s hosszúságú depolarizáló pulzus utolsó 1000 ms-a alatt történt (22A ábra). A T449A/V476C konstrukt teljes mértékben

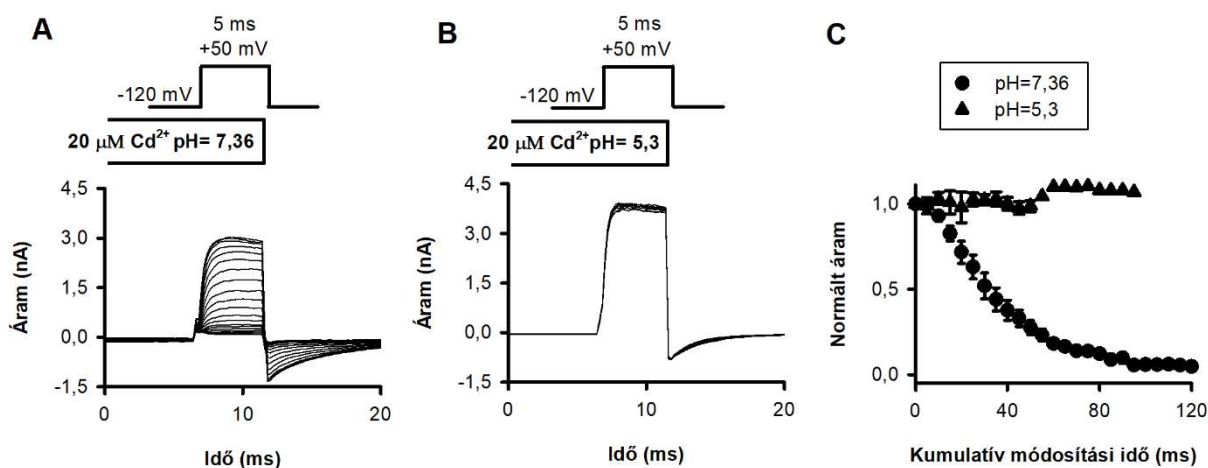
inaktiválódik a Cd^{2+} kezelés kezdetére (**20D** és **22A ábrák**, $\tau_i = 136$ ms, a Cd^{2+} alkalmazása az inaktivációs időállandó több, mint 7-szeresének megfelelő idő elteltét követően történik). A fennmaradó időtartam alatt a patch-et standard intracelluláris oldattal perfundáltuk. A kezelés a csúcsáram teljes eltűnését eredményezte már egy impulzust követően, azaz a Cd^{2+} által nyitott állapotban rögzített aktivációs kapuval rendelkező csatornák nem képesek az inaktivációból való visszatérésre ($n=5$). Ezek alapján azt gondoljuk, hogy a csatornák a Cd^{2+} kezelés hatására az OI állapotban rögzültek, így vezetőképtelenek maradtak még a 60 s időtartamú -120 mV-os tartófeszültséget követően is, ami a kontroll körülmények között elegendőek bizonyult az inaktivációból történő visszatéréshez. Az áram csökkenése irreverzibilis volt. Az áramcsökkenés kinetikáját az OI állapotú csatornák rövidebb, egymás után ismétlődő 200 ms-os Cd^{2+} expozíciójával határoztuk meg (**22B ábra**). Ez a kezelés a kumulált expozíció során a csúcsáramok kvantált és szignifikáns mértékű csökkenését eredményezte (**22C ábra**). Az áramcsökkenés mértéke a kumulált modifikációs idő függvényében exponenciális csökkenést mutatott, amely a 476C pozícióban elhelyezkedő cisztein aminosav és a Cd^{2+} közötti specifikus kölcsönhatás jelenlétére utalt.



22. ábra Az inaktivációból való visszatérés mértékének meghatározása Cd^{2+} révén nyitott állapotban rögzített aktivációs kapuval rendelkező T449A/V476C Shaker-IR csatornában

A-B: Az ábrán bemutatott, egymásra vetített áramgörbék méréséhez egy T449A/V476C Shaker-IR csatornákat kifejező HEK-293 sejtől húzott inside-out patch-et ismétlődően depolarizáltunk $+50$ mV-ra 2 s-on keresztül a -120 mV-os tartófeszültségről indulva a panel felső részén bemutatott pulzusprotokoll szerint. Az ipi 60 s volt. A patch intracelluláris irányból történő, $20 \mu\text{M}$ -os Cd^{2+} expozíciójának kezdetét és időtartamát az ábrán az üres vízszintes oszlopok jelzik. **(A)** Az 1000 ms hosszúságú $20 \mu\text{M}$ Cd^{2+} -os perfúzió 1000 ms-mal a depolarizáló pulzusok kezdete után indult. A fennmaradó időben, valamint a pulzusok közötti tartófeszültség tartama alatt Cd^{2+} mentes intracelluláris oldattal perfundáltuk a patch-et. Az A panelen a számok az első és a második áramgörbét jelzik. **(B)** A 200 ms hosszúságú $20 \mu\text{M}$ Cd^{2+} -ot tartalmazó oldattal történő perfúzió 1800 ms-mal a depolarizáló pulzusok kezdete után indult. A fennmaradó időben, valamint a pulzusok közötti tartófeszültség tartama alatt Cd^{2+} mentes intracelluláris oldattal perfundáltuk a patch-et. A B panelen a számok az első és az utolsó áramgörbét jelzik. **(C)** A mérések kiértékelése során meghatároztuk a csúcsáramok nagyságát és normáltuk az első pulzus alatt nyert csúcsáramra (amely még Cd^{2+} mentes környezetben lett meghatározva), majd az így kapott értékeket a $20 \mu\text{M}$ Cd^{2+} kumulált expozíciós idejének függvényében ábráztuk. A folytonos vonal az átlagolt adatpontokra legjobban illeszkedő exponenciális függvényt mutatja. Az ábrák az $n=5$ kísérlet során nyert adatok átlagát \pm SEM mutatják.

Annak igazolására, hogy az általunk használt inaktiválódó V449A konstruktban a funkcionálisan nem vezető OI állapotot a 476C és H486 aminosavak között kialakuló Cd^{2+} -híd hozza létre, megvizsgáltuk, hogy a Cd^{2+} által okozott áramcsökkenést kivédi-e a H486 alacsony pH-n végbemenő protonációja. A deprotonált állapotú H486 nélkülözhetetlen a 476C aminosavval Cd^{2+} segítségével alkotott fémhíd kialakulásához^{23,187}. Ennek vizsgálatához +50 mV-os depolarizáló pulzusokat alkalmaztunk 15 s-onként -120 mV-os tartófeszültségről indulva. A Cd^{2+} applikációja minden pulzus előtt 200 ms-mal kezdődött és a depolarizáció befejezésével egyidőben végződött. A Cd^{2+} -ot tartalmazó intracelluláris oldat pH-ját 7,36-ra (**23A ábra**) vagy 5,3-ra (**23B ábra**) állítottuk. Az aktivációs kapu nyitott állapotban történő rögzítését 7,36-os pH-n (**23A ábra**) a farokáramok 23B panelhez képest megnövekedett relatív amplitúdója jelzi, ami ezt követően az inaktivációból fakadóan lassan csökkenni kezd. A mérések során a +50 mV-os pulzusok által kiváltott csúcsáramok pulzusról pulzusra bekövetkező folyamatos csökkenése azt mutatja, hogy a nyitott állapotban rögzített és inaktivált csatornák nem térnek vissza az inaktivációból (**23A ábra**). A nyitott állapotban rögzített aktivációs kapuval rendelkező *Shaker* csatornák inaktivációját, valamint az általunk megfigyelthez hasonló farokárammal rendelkező áramfenotípust már korábban leírták V476C mutációt hordozó *Shaker* esetén^{23,185,187}. Ezzel ellentétben 5,3-as pH-n, ahol a fémhíd kialakulása gátolt, a +50 mV-os pulzusok által kiváltott csúcsáramok amplitúdója nem változik az ismételt depolarizációk alatt (**23B ábra**). A normált csúcsáramok nagysága csökken a Cd^{2+} kumulált applikációja során 7,36-os pH-n (fekete körök), ezzel szemben 5,3-as pH jelenlétében (fekete háromszögek) a csúcsáramok nagysága állandó marad (**23C ábra**) (n=4-5).



23. ábra Az alacsony pH megakadályozza a fémhíd képződését a Cd^{2+} alkalmazása során

A-B: T449A/V476C csatornákat kifejező inside-out patch-eket -120 mV-os tartófeszültségről ismétlődően depolarizáltunk +50 mV-ra 15 s-onként 20 μM Cd^{2+} jelenlétében 7,36-os (**A**) és 5,3-as pH-n (**B**). A Cd^{2+} -ot 200 ms-on keresztül intracellulárisan alkalmaztuk a csatornák nyitása előtt és a +50 mV-os depolarizáció alatt. A pulzusprotokollokat a megfelelő pulzusok közötti intervallumok mellett három-négy alkalommal futtattuk le Cd^{2+} hiányában a csúcsáramok stabilitásának igazolása céljából (be nem mutatott adatok). (**C**) Minden pulzus esetén a

csúcsáramok nagyságát normáltuk az első pulzus során kapott csúcsáramra és a kumulált modifikációs idő függvényében ábrázoltuk. A különböző szimbólumok által jelzett eredményeket 7,36-os (fekete körök) és 5,3-as pH-n (fekete háromszögek) kaptuk. A feltüntetett hibák a n=4-5 kísérlet adataiból számított SEM értékeket mutatják.

5. Diszkusszió

5.1 A szterolok nem a VSD-n keresztül fejtik ki hatásukat K_V ioncsatornában

A dolgozatban bemutatott kísérleteink első csoportja során azt kívántuk meghatározni, hogy a koleszterin a K_V csatornák melyik funkcionális doménjén fejtik ki a csatornák kapuzására gyakorolt már korábban leírt hatásait. E célból két különböző VSD-PD csatolási mechanizmussal rendelkező K_V csatornát expresszáztunk afrikai karmosbéka oociták membránjában, amelyek koleszterin, illetve 7DHC tartalmát a szterolok M β CD-vel alkotott komplexeivel növeltük. A két funkcionális domén feszültségfüggő egyensúlyi és kinetikai paramétereit egymástól független módon követtük nyomon voltage-clamp fluorimetria segítségével egyszerre vizsgálva az ionáramokat és fluoreszcens jeleket. Hasonló hatásokat figyeltünk meg $K_V1.3$ és $K_V10.1$ csatornákon a szterol kezelések eredményeként, a két esetben tapasztalt kis különbségeket a csatornák különböző kapuzási mechanizmusai okozhatták.

Kísérleteink arra utalnak, hogy a szterolok moduláló hatásának elsődleges közvetlen célpontja a pórusdomén vagy a domének közötti csatolási apparátus, és nem a VSD átmeneteinek szterolok által indukált változásai tevődnek át a pórusra. Ezt több megfigyelésünk is alátámasztotta:

i) A szterol töltések hatására a pórus nyitásának feszültségfüggése eltolódott a VSD aktivációjának változása nélkül, amely a pórusnyitás energetikájában bekövetkező változásra utal (**7. és 10. ábrák**). Ez a megfigyelés magában foglalja a két funkcionális domén közötti csatolás esetleges megváltozását is, hiszen a $G_{\text{norm}}-V$ és $F_{\text{norm}}-V$ görbék nem egymással párhuzamosan változtak. A K_V csatornák kristályszerkezetei és MD szimulációs vizsgálatai is alátámasztják megfigyeléseinket, amelyeken jól látszik, hogy a VSD-k a membránba beágyazottan helyezkednek el, míg az S4 hélixek a lipidektől elzárva találhatók²⁰⁴. Bár $K_V1.3$ esetén az $F_{\text{norm}}-V$ görbék középpontja nem tolódott el, a görbék meredeksége kis mértékben csökkent koleszterin kezelése hatására, ugyanakkor 7DHC esetén a hatás nem volt szignifikáns (**7B ábra**). Ez azt mutatta, hogy a VSD nyugalmi és aktivált állapotainak energiája közötti különbség nem változott, viszont a látszólagos kapuzási töltés (gating charge) lecsökkent koleszterin töltés hatására. Ennek hátterében valószínűleg a membrán elektromos térerősségprofiljának koleszterin hatására történő megváltozása állhat, ismert ugyanis, hogy a membrán dipólpotenciáljának nagysága függ a membrán koleszterin tartalmától¹²². MD számítások megerősítették, hogy a lipidösszetétel megváltozása átalakíthatja a csatornát körülvevő elektromos térerősség eloszlását és észlelhető mértékben módosíthatja a kapuzási

töltést (gating charge-ot) ²⁰⁴. Hasonló meredekségváltozást K_v10.1 esetén nem figyeltünk meg (**10B ábra**), a kontroll és kezelt sejtek F_{norm}-V görbéi ennél a csatornánál teljes mértékben átfedtek. A két csatorna közötti különbséget magyarázhatja az a K_v10.1 krio-elektronmikroszkópos szerkezetének elemzésén alapuló megfigyelés, mely szerint K_v10.1-ben az S4 egy 3₁₀ hélix csavarulattal a membrán citoplazma felé néző oldala felé van eltolva a K_v1.2-2.1 kiméra csatorna S4 hélixéhez képest ¹⁷. Az utóbbi csatorna szerkezete a K_v1.3-hoz hasonlít. Ez azt jelenti, hogy a két csatorna VSD-je valószínűleg a membrán különböző szegmensein halad keresztül az aktiváció során és ezáltal a mozgás alatt eltérő térerősségprofil hat rájuk.

Mind a 309C, mind pedig WT K_v1.3 csatornák esetén a szterolok az egyensúlyi inaktivációt leíró görbét a G_{norm}-V görbénél megfigyeltekkkel azonos irányban tolták el, bár ezek az eltolódások ellentétes polaritásúak voltak a két konstruktban (**6B, C és 9C, D ábrák** valamint **7B, C, és 10B, C ábrák**). K_v1.3-ban megfigyelhető a C-típusú inaktiváció jelensége, amely a szelektivitási szűrő átrendeződésével jár és megakadályozza a K⁺ ionok átjutását a póruson. Ahogy azt a dolgozat második részében bemutattuk, illetve korábban mások is utaltak rá ⁶⁰, a két kapu közti szoros csatolás miatt a C-típusú inaktiváció csak a pórus nyitása után megy végbe még olyan tartófeszültségeken is, ahol makroszkópos áramok nem figyelhetők meg és az egyedi csatornák csak nagyon alacsony valószínűséggel nyitnak. Így a nyitási átmenet feszültségfüggését eltoló szterol dúsítástól várható, hogy az SSI görbét is ezzel párhuzamosan tolja el (**6. és 8. ábrák**), ahogy azt kísérleteink során mi is megfigyeltük.

ii) Mindkét csatorna esetén a pórus nyitásának kinetikája lelassult, míg a VSD aktivációs kinetikája nem változott jelentősen a szterolokkal történő kezelés hatására (**11. ábra**). K_v1.3-nál az áram aktivációjának időállandói szignifikánsan megnöttek az általunk vizsgált teljes feszültségtartományban (**11A ábra**), míg K_v10.1-ben a növekedés elsősorban +10 mV felett volt nyilvánvaló (**11C ábra**). Utóbbi csatornánál csak a VSD aktiváció gyengén feszültségfüggő, gyors komponense, amely depolarizált membránpotenciálok esetén a pórus nyitásához kapcsolódik, lassult a szterol töltések hatására (**11E ábra**), a hiperpolarizált membránpotenciálok esetén megfigyelhető fő feszültségfüggő átmenetek viszont függetlennek bizonyultak a szterol töltésektől. A K_v10.1 VSD-jének kétfázisú aktivációját már korábban leírták ¹⁹⁴, amely során elkülöníthetők a hiperpolarizált potenciálok esetén megfigyelhető lassú átmenetek és a nyitott állapot kialakulását közvetlenül megelőző gyors átalakulások. Eredményeink alapján a szterol töltések utóbbiakat modulálják az előbbieik módosítása nélkül (**11D, E ábrák**). A VSD-mozgás gyors komponensének lassulása háttérben a pórus VSD-re gyakorolt retrográd irányú hatásai állhatnak. K_v10.1 esetén a csatolás eltér a K_v1.3-ban

leírtakhoz képest, ugyanis előbbiben az S4-S5 linker nem szükséges a VSD és PD közötti kommunikációhoz, mivel annak átvágása vagy teljes deléciója sem akadályozza meg a pórus feszültségfüggő nyitását¹⁹. A Kv10.1-ről azt feltételezik, hogy a VSD-PD csatolás közvetlen hélix-hélix kölcsönhatások segítségével megy végbe, így lehetséges, hogy a PD késleltetett konformációváltozása retrográd irányban hatva befolyásolja a VSD végső konformációjának átrendeződését.

iii) Kv10.1 csatornáknban a szterolok befolyásolták a Cole-Moore shiftet, így amikor a csatornákat a mélyebb zárt állapotok valamelyikéből nyitottuk ki (erősen hiperpolarizált membránpotenciálok esetén), az áram aktivációs kinetikáját nem befolyásolták a szterolok, amikor azonban a nyitás közvetlenül a nyitás előtti zárt állapotból történt (depolarizáltabb membránpotenciálok esetén), az áram aktivációs kinetikája szignifikánsan lelassult (**12. ábra**). Ez összeegyeztethető a Kv10.1 krio-EM szerkezetéből levezetett feltételezett kapuzási mechanizmusával¹⁷. A modell szerint a VSD hiperpolarizált vagy nyugalmi állapotában az S4 hélix citoszolhoz közeli vége meglöki a C-linkert az S6 elhajlását okozva, amely a pórus rotációs konstrikióját és ezáltal annak zárását eredményezi (**4. ábra** a Célkitűzésekben). Depolarizált vagy aktivált állapotban az S4 az extracelluláris tér irányába mozog, ami megszünteti az S6 elhajlását, lehetővé téve a csatorna nyitását. Feltételezések szerint nyugalmi állapotban a PAS domén (**4. ábra** barna gömb) N-terminális vége kölcsönhat az S4 hélixszel, stabilizálva azt, és ez okozza a hiperpolarizált membránpotenciálok esetén megfigyelhető Cole-Moore hatást. Mivel a krio-EM szerkezet alapján a PAS domén S4 hélixszel való kölcsönhatása valószínűleg a citoplazmában és nem a membránban történik, így lehetséges, hogy a VSD mély zárt állapotok közötti átmenetei során fellépő konformációs változásait nem befolyásolja a membrán összetétele. Ezzel szemben kevésbé hiperpolarizált membrán mellett az S4 hélix fentebb említett kölcsönhatása az S6 hélixszel és a következményesen kialakuló, az S6 hélixnek a pórus konstrikióját okozó elhajlása, valamint annak a csatorna nyitását eredményező kiegyenesedése várhatóan a membránban zajlik, ezáltal befolyásolja azokat a körülvevő membránlipid-környezet.

iii) A szterolok lecsökkentették az áramok amplitúdóit mind vad típusú, mind a cisztein mutációt hordozó csatornáknban annak ellenére, hogy nem okoztak eltolódást az $F_{\text{norm}}-V$ görbékben, illetve ellentétes előjelű eltolódást eredményeztek a vad típusú és a cisztein mutáns csatornák $G_{\text{norm}}-V$ görbéiben (**9. és 13. ábrák**). Ezek arra utalnak, hogy az áramcsökkenés a pórusra és nem a feszültséget érzékelő apparátusra gyakorolt hatásból ered. Nem-egyensúlyi zajanalízis során kapott eredményeink alapján a szterolok által okozott áramredukció oka elsősorban az egyedi csatorna konduktancia csökkenése és nem a nyitási valószínűség

változása. Az egyedi vezetőképesség változása is arra utal, hogy a szterolok inkább közvetlenül a pórusra, mint a VSD-PD közötti csatolási apparátusra hatnak.

5.2 A membránstressz szerepe a szterol hatások mediálásában

Jól dokumentált megfigyelés, hogy a membrán feszülése, amit például a patch pipetta is okoz, alapvetően befolyásolja az ioncsatornák, így a K_v csatornák kapuzását. Egyszerű mechanisztikus modell alapján a membrán feszülése kedvező a pórus terület / térfogat expansziójával járó nyitása során fellépő konformációváltozások számára, így az a csatorna aktivációs kinetikájának gyorsulását, feszültségfüggésének hiperpolarizáció irányába történő tolódását és az áramamplitúdó növekedését eredményezi. Régóta ismert, hogy a koleszterin megnöveli a laterális stressz nagyságát a lipid membránokban¹¹³, ami nagyban hozzájárulhat a membránba ágyazott fehérjékre gyakorolt hatásaihoz. A feszüléssel ellentétben a megnövekedett laterális stressz várhatóan inkább a csatorna zárt állapota számára kedvező, így lassíthatja a nyitási kinetikát és csökkentheti a konduktanciát²⁰⁵. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban a legtöbb irodalmi adat szerint a koleszterin mennyiségének növekedése általában lecsökkenti a csatornák aktivitását, valószínűleg a csatorna összenyomása és az annuláris rétegben megnövekedett viszkozitás révén. Ilyen egyszerű modell azonban nem képes megmagyarázni a feszültségfüggésben és a kapuzási kinetikában bekövetkező egymással nem korreláló változásokat. Például mindkét szterol minden csatorna konstrukt esetén (WT és cisztein mutánsok) konzisztens módon az áram aktivációs kinetikájának lassulását okozta (**6D**, **9B**, **11A**, **11C ábrák**), míg a szterolokkal történő töltések eredményeképp létrejött G_{norm} -V eltolódások ellentétes előjelűek voltak a vad típusú és a cisztein mutáns konstruktokban (**6B**, **6C**, **7B**, **7C**, **9D**, **9E**, **10B**, **10C ábrák**). Ezek alapján egy egyszerű előre irányú (C \rightarrow C \rightarrow O) átmenet koleszterin kezelés hatására bekövetkező lassulása nem magyarázza az összes megfigyelt hatás kialakulásának mechanizmusát.

5.3 Lipidutajbéli lokalizáció változása szterol töltések hatására

A sejtmembrán szterolokkal való töltése különböző csatornákra eltérő hatást gyakorol, aminek háttérében a csatornák és szterolok membránbeli eloszlásának különbségei is állhatnak. Több csatornáról, így a $K_v1.3$ -ról és a $K_v10.1$ -ről is kimutatták, hogy preferenciálisan a szfingolipidekben és koleszterinben gazdag lipidutajokban helyezkedik el^{138,141,197}, míg más csatornák ezen mikrodoméneken kívül találhatóak¹⁴². Az irodalmi adatokkal összhangban

preferenciális lipidtutajbeli lokalizációt jelentő erőteljesen pozitív Pearson-együtthatókat kaptunk mindkét csatorna vizsgálata során, amelyek nagysága tovább növekedett a membrán mindkét szterollal való töltése után (**14. ábra és 2. táblázat**). A jelenséget bizonyítottuk $K_{V1.3}$ esetén a sokkal jobb felbontást biztosító STED mikroszkópia alkalmazásával is, így a hagyományos konfokális mikroszkópiához képest jóval kisebb feloldható távolságok mellett is megerősítettük a csatorna preferenciális tutajbeli lokalizációját és ezen mikrodoménekben való további dúsulását a szterol kezelések hatására. NBD-koleszterinnel végzett méréseink azt mutatták, hogy az exogén módon bejuttatott koleszterin szintén preferenciálisan a lipidtutajokban akkumulálódik. Pozitív korrelációt tapasztaltunk továbbá a $K_{V1.3}$ és az NBD-koleszterin között, a koefficiens nagysága szignifikánsan magasabb volt, mint a fluoreszcensen jelzett koleszterin és a lipidtutaj marker között meghatározott érték. Ez azt sugallja, hogy az exogén módon bejuttatott koleszterin elsősorban a $K_{V1.3}$ csatornákat tartalmazó tutajokban dúsul, amely a koleszterin és $K_{V1.3}$ molekulák közötti kölcsönhatásra utalhat.

A csatornák körüli lokális szterolkörnyezetet erőteljesen meghatározza azok lipidtutajok iránti affinitása, amely függhet a szterolok koncentrációjától. A $K_{V1.3}$ és a $K_{V10.1}$ hasonlóan reagált a szterol kezelésekre erőteljes preferenciát mutatva a lipidtutajbeli elhelyezkedés iránt. Figyelembe véve az ismert tényt, hogy a tutajbeli lokalizáció jelentősen módosítja az ioncsatornák funkcióját, eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a szterolok $K_{V1.3}$ -ra és $K_{V10.1}$ -re gyakorolt funkcionális hatásait legalábbis részben ezen csatornák megváltozott tutaj és nem-tutaj membránmikrodomének közötti megoszlása mediálja.

5.4 A szterol töltések által okozott áramcsökkenés oka

Több csatorna esetén leírták, hogy a membránfeszülés hatására növekszik a teljes sejtben mérhető ionáram nagysága, amelynek háttérében a csatornák nyitási valószínűségének növekedése áll az egyedi csatornák konduktanciájának változása nélkül²⁰⁶⁻²⁰⁹. A legtöbb vizsgált ioncsatorna, így a K_V csatornák esetén is a koleszterin mennyiségének növekedése az áram amplitúdójának csökkenését eredményezi, összhangban azzal, hogy a koleszterin növeli a laterális stressz mértékét. Az áram redukciójának háttérében azonban nem mindig a stressz által okozott csökkent nyitási valószínűség áll. Az áramcsökkenés oka különböző csatornák esetén eltérő lehet. Kimutatták ugyanis, hogy bizonyos csatornák esetén a csatornák nyitási valószínűségének^{210,211}, az aktív csatornák számának²¹² vagy az egyedi csatornák konduktanciájának²⁰⁵ csökkenése is eredményezhet áramcsökkenést.

Kísérleteink során mind a WT, mind a cisztein mutációt hordozó $K_v1.3$ és $K_v10.1$ csatornában a szterol töltések hatására lecsökkent az áramok amplitúdója (**9. és 13. ábrák**) és lelassult azok aktivációs kinetikája (**6D, 9B, 11A, 11C ábrák**), függetlenül a G_{norm} -V görbék eltolódásának irányától. Ez arra utal, hogy a szterol töltések hatására nem a nyitási valószínűség változik, mivel a nyitott állapotba vezető átmenet módosítása esetén a G_{norm} -V görbék is a többi paraméterrel megegyező irányban tolódnának el. Membránfeszülés hatására ilyen párhuzamos eltéréseket írtak le a félaktivációs feszültségben, a G_{norm} -V görbék meredekségében és a P_o maximális értékében, amely eltérések egyszerre magyarázhatóak a nyitási átmenet egyedüli módosulásával, szemben a szterol töltések esetén általunk megfigyeltekkel ²¹³.

BK csatorna esetén ismert, hogy a membránban található koleszterin mennyiségének növekedésére a nyitási valószínűség és az egyedi konduktancia is egymással párhuzamosan lecsökken ²⁰⁵. Az egyedi csatornán átfolyó áram csökkenésének hátterében a pórus laterális stressz hatására bekövetkező kompresszióját valószínűsítették, a szelektivitási szűrőre gyakorolt hatás nélkül. Mivel sem korábbi irodalmi adatok, sem pedig a mi méréseink nem utaltak arra, hogy szterol töltés hatására megváltozik a csatorna szelektivitása, a szelektivitási szűrő valószínűleg intakt marad. Korábbi számítások alapján az egyedi csatornák konduktanciájának csökkenését a pórus szelektivitási szűrője és az intracelluláris oldalon található aktivációs kapu közötti hidrofil üreg méretcsökkenése okozhatja ^{205,214,215}. Az üreg térfogatcsökkenése miatt lecsökkenhet az áthaladó ionok áramlási sebessége/fluxusa, illetve a megváltozott alakú pórusban a felszínre kerülő töltések miatti lokális elektromos potenciál is módosulhat, melyek magyarázhatják a csökkent vezetőképességet. Újjonnan leírt szerkezeti információkon alapuló számítások megerősítették, hogy az egyedi konduktancia nagyon érzékeny az üreg átmérőjének kismértékű módosulásaira is ²¹⁶, így a pórus kismértékű stressz indukálta alakváltozása is az egyedi csatornák konduktanciáinak csökkenését okozhatja.

5.5 A szterolok által okozott változások specificitása, a koleszterin és a 7DHC által kifejtett hatások összehasonlítása

Kísérletes rendszerünkben a koleszterin és a 7DHC kezelés nagyon hasonló módon változtatta az ioncsatornák funkcióját. Nem találtunk érdemi különbséget a csatornák kinetikai paramétereire, illetve lipidtutajokkal való asszociációjára gyakorolt hatásaik között. A 7DHC minőségében hasonlóan, de kissé nagyobb mértékben módosította a pórusnyitás feszültségfüggését és csökkentette az ionáramok nagyságát.

A koleszterin és a 7DHC hatásait összehasonlító korábbi adatok ellentmondásosak, mivel néhány tanulmány szerint a két szterol hatása megkülönböztethetetlen egymástól, míg mások a lipidekkel és fehérjékkel való kölcsönhatásaikban jelentős különbségeket találtak. A 7DHC-ről például leírták, hogy szarvasmarha eredetű lipidekből felépülő liposzómamembránokban ugyanolyan hatékonysággal épül be a tutajokba, mint a koleszterin, ugyanakkor a 7DHC-ben gazdag tutajok fehérjeösszetétele eltér a koleszteringazdag mikrodoménekétől ²¹⁷. Koleszterint, illetve 7DHC-t nagy mennyiségben tartalmazó membránok szerveződése és dinamikája között jelentős különbségeket találtak ²¹⁸, míg egy másik tanulmányban különböző összetételű liposzómákban ezen szterolok eltérő hajlamot mutattak a gél, illetve fluid fázisú lipiddomének formációjára ²¹⁹. Egy MD szimuláción alapuló tanulmányban nem mutattak ki különbséget a koleszterin és a 7DHC membránok kondenzációjára és rendezettségére gyakorolt hatásai között ²²⁰, míg egy másik MD-alapú tanulmányban a membrán laterális nyomás profilja és elasztikus paraméterei jelentősen megváltoztak, amikor a koleszterin molekulákat 7DHC-ra cserélték ²²¹. Szerkezetük nagyfokú hasonlóságának tükrében váratlanul nagy kvantitatív különbségeket találtak a két szterol hatásai között, különösen telített lipidekből felépülő bilayerek esetén. Ezen adatok arra utalnak, hogy a koleszterin és a 7DHC membránok szerveződésére és dinamikájára gyakorolt hatásai közötti különbség nagysága erősen függ a membrán összetételétől, valamint valószínűleg nagyobb mértékű szaturált lipideket tartalmazó környezetben. A lipidtutajok telített lipidekben gazdag régiók, eredményeink alapján pedig mindkét csatorna és mindkét lipid preferenciálisan a tutajokba lokalizálódik. Ez a lipid környezet felerősítheti az indirekt, membrán által mediált szterol hatások különbségeit.

Szerotonin 1A receptorral végzett kísérletek a szterolokkal való specifikusabb kölcsönhatásra utaltak, mivel ezen fehérjék ligand kötése lecsökkent, amikor a membránban a koleszterin molekulákat 7DHC-ra cserélték, annak ellenére, hogy fluoreszcencia anizotrópia mérések alapján a membrán általános szerkezete és rendezettsége változatlan maradt ²²².

A specifikus szterol-csatorna kölcsönhatások vizsgálata során nyert legfrissebb bizonyítékok alapján kismértékű szerkezetbeli eltérések nem befolyásolják a hasonló szterolok bekötődését a csatornafehérjéken található kötőhelyekre, a funkcionális hatás kiváltásához ugyanakkor specifikus ligand bekötődésére van szükség ¹²³. Így amikor a 7DHC mennyisége megnő, a kötőhelyen helyettesítheti ugyan a koleszterint, de a 7DHC valószínűleg nem viselkedik a csatorna funkcióját befolyásoló fiziológiás ligandként. Az ebben az esetben megfigyelt 7DHC hatások tehát inkább a koleszterin kötődés hiánya miatti funkcionális következményekre vezethetők vissza.

5.6 A Kv1.3 és Kv10.1 ioncsatornák szterolok általi modulációjának jelentősége különböző betegségekben

A szérum szterolszintek patológiás állapotokban megfigyelhető eltérései esetén a sejtmembrán összetétele is megváltozhat, ami befolyásolhatja a membránfehérjék, így az ioncsatornák funkcióját. A Bevezetés 1.8-as fejezete alapján is belátható, hogy mivel mind a Kv1.3, mind pedig a Kv10.1 számos fiziológiás és patológiás folyamat szabályzásában részt vesz, ezáltal az ioncsatornák szterolok általi modulációjának kiemelt szerepe lehet az adott folyamatok befolyásolása tekintetében. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy hiperkoleszterinémias (HC) betegek T-sejtjeinek membránjában a kontrollokhoz képest megnő a koleszterin mennyisége, de ezen eltérések nem érik el azt a mértéket, ami az *in vitro* M β CD komplexekkel való töltés után figyelhető meg¹⁹⁰. A Kv1.3 kapuzásában csak kismértékű eltéréseket találtunk és azokat is inkább az oxidált LDL partikulumok által okozott lipidtutajokat roncsoló hatásnak, mint a szérum koleszterin direkt hatásának tulajdonítottuk. Mindazonáltal a T-sejtek proliferációs válasza, amelyben kulcsszerepet játszik a Kv1.3, eltérő volt HC betegekben, mivel a spontán aktivációs ráta magasabbnak, a CD3/CD28 útvonalon történő aktiváció ugyanakkor gátoltnak mutatkozott.

Munkacsoportunk korábbi kutatásainak eredményei azt mutatták, hogy SLO betegekből származó vörösvértestek membránjában a 7DHC szintje emelkedett, míg a koleszterin csökkent, továbbá a 7DHC az általunk is megfigyelt elektrofiziológiai hatásokat fejtette ki az SLO-ban szenvedő betegek T-sejtjeiben található Kv1.3 ioncsatornára¹⁴⁶. Ennek funkcionális következményeként az SLO-s T-sejtek aktivációja és proliferációja lecsökkent, amely a CD154+ sejtek arányának csökkenésében és alacsonyabb osztódási indexben nyilvánult meg. Ezek a jelenségek hozzájárulhatnak az SLO-ban jellemző immundeficiencia kialakulásához^{223,224}. Egy másik tanulmányban SLO-s betegek bőréből származó, a sejtmembránban megnövekedett 7DHC tartalommal bíró fibroblasztokban az általunk tapasztaltakhoz nagyon hasonló eltéréseket írtak le a nagy konduktanciájú kalcium által aktivált KCa1.1 csatornában: a G-V görbe eltolódott és az egyedi csatornák konduktanciája lecsökkent²²⁵. A csatorna különböző szövetekben megfigyelhető széleskörű előfordulását figyelembe véve a funkciójának SLO-ban megfigyelhető megváltozása szerepet játszhat a betegség tüneteinek kialakulásában.

Tumorsejtekben a koleszterin akkumulációját és a lipidtutajok következményes expansióját figyelték meg, amelynek az onkogén szignalizációs útvonalak felerősödésében

lehet szerepe. A tutajok integritása kulcsfontosságú a tumorsejtek túlélése és proliferációja szempontjából, mivel azok M β CD-vel történő roncsolása potens gátló hatásúnak bizonyult^{226,227}. Sokféle tumorsejt fejez ki K_V10.1-et, ami döntően a lipidtutajokban helyezkedik el, és ismert, hogy a csatorna fontos a sejtproliferáció és a tumorprogresszió szempontjából¹⁴¹. Jelen kísérleteinkben kimutattuk, hogy a szterol töltés tovább növeli a K_V10.1 tutajbéli lokalizációját, amely potenciórozhatja az onkogén jelátviteli útvonal hatékonyságát. Bár eredményeink alapján a szterolok szintjének növekedése gátolja a K_V10.1 ionáramát, korábbi feltételezések szerint a csatorna onkogén potenciálja annak nonkanonikus funkciójával és nem feltétlenül az ionkonduktanciájával függhet össze²²⁸.

5.7 A koleszterin K_V ioncsatornákra gyakorolt hatásmechanizmusának általunk javasolt modellje

Eredményeink azt mutatják, hogy a membrán megnövekedett szterol tartalma nem a feszültségszenzor domén működését befolyásolja, és valószínűsíthetően nem a két domén közti csatolási apparátusra hat, hanem közvetlenül a pórusdoménen fejt ki a hatását. A szterolok által a pórusra gyakorolt hatások hátterében szerintünk fontos tényező a laterális stressz mértékének nem-specifikus megnövekedése, amely hátráltatja a pórusnyitáshoz vezető átrendeződéseket és csökkenti a konduktanciát a pórus belső üregének deformálása révén. Emellett a korábban leírtak szerint^{205,229} a szterolok koncentrációjának növekedése a membránban megnövelheti a zárt-nyitott átalakulás entalpiáját, azonban a nyitás alatt bekövetkező konformációváltozás ezzel párhuzamosan az entrópia mértékét is növeli, így a szabadenergia-változás előjele és ezáltal a G_{norm}-V görbe eltolódásának iránya is ezen tényezők egymáshoz viszonyított relatív nagyságától függ. Méréseink során érdekes megfigyelés volt, hogy vad típusú K_V1.3 és K_V10.1 csatornáknál a szterol töltés a G_{norm}-V görbéket jobbra tolta el, míg a TEVCF kísérletek során használt cisztein mutációt hordozó csatornák esetén ezzel szemben a szterol töltések balra történő eltolódást eredményeztek. Az egyéb hatások, így az áramcsökkenés és az áram aktivációs kinetikájának lassulása tekintetében hasonlóan viselkedtek a WT és a ciszteinmutáns csatornák. Ehhez hasonló, ellentétes irányú G-V eltolódásokat megfigyeltek WT és ILT mutáns *Shaker* csatornák esetén, amely mutáns-specifikusnak, nem pedig artefaktumnak bizonyult, és a jelenséget a membránfeszülés hatásának tulajdonították²²⁹. A mi eredményeinkhez hasonlóan az ILT mutáns *Shaker* csatornában is azt mutatták ki, hogy a VSD-k elmozdulását követően a végső sebességmeghatározó lépés az aktivációs kapu nyitása, és ez a lépés az, ami a membrán tenziójára érzékeny. Ennek következtében a membrán stressz csatornafunkcióra gyakorolt

hatásának előrejelzése nem egyértelmű, amely megmagyarázhatja a témában publikált eredmények közötti gyakori ellentmondásokat. Továbbá a szterolok bizonyos csatornákkal történő specifikus kölcsönhatásai a hatásokat váratlan irányba téríthetik el. Méréseink alapján a direkt hatások elsődleges hozzájárulása a szterolok K_v ioncsatornákra gyakorolt hatásaihoz nem valószínű, mivel mind a koleszterin, mind pedig a 7DHC hasonló változásokat okozott két különböző csatolási mechanizmussal rendelkező K_v csatorna esetén is. A végső, koleszterin által kifejtett hatáshoz hozzájárul bizonyos csatornák lipidtutajokban történő dúsulására való hajlama is, mivel a csatornák lipidtutajbeli lokalizációja nagyban befolyásolja a csatornák által érzékelt lokális szterol koncentráció nagyságát.

Összegezve megfigyeléseinket, K_v csatornáknál a szterolok fő támadáspontja a PD, nem pedig a VSD, továbbá a szterol hatások tekintetében a domináns tényező a laterális stressz, ami a szterolok membránbeli szintjének növekedése hatására növekszik. A laterális stressz hatását továbbá valószínűleg specifikusabb, direkt szterol-csatorna kölcsönhatások is modulálhatják. Így bár modellünkben az indirekt koleszterin hatások K_v csatornákra gyakorolt szerepét hangsúlyozzuk, a globális hatás tekintetében nem zárható ki a direkt kölcsönhatások szerepe sem, mivel nem mindegyik vizsgált kapuzási paraméter esetében figyeltük meg az egymással párhuzamos változásokat, ami várható lenne kizárólagosan indirekt hatásmechanizmus esetén. K_v csatornáknál ugyanakkor, más csatornákhöz és transzmembrán fehérjékhez hasonlóan, megkérdőjelezhető a CRAC és CARC motívumok direkt koleszterin hatások mediálásában betöltött szerepe. Ezt támasztja alá, hogy míg $K_v1.3$ esetén az S4 hélix C-terminális végén található egy CARC szekvencia, ennek ellenére a membrán koleszterin töltésének nincs funkcionális következménye a VSD csatorna aktiváció során bekövetkező mozgásaira. Ezzel szemben, ahogy azt a kísérleteink során kimutattuk, TEVCF mérések során nem változik a fluoreszcens jel feszültségfüggését leíró $F_{norm}-V$ görbe, valamint a fluoreszcens jel aktivációs időállandója, így a VSD mozgása sem szterol töltések hatására.

5.8 Az aktivációs kapu szerepe az egyensúlyi inaktiváció és az inaktivációból való visszatérés folyamatainak szabályozásában negatív membránpotenciálok esetén

A *Shaker*-IR csatorna kapuzásának leírására jól használható közelítés a négyállapotos kapuzási modell (2A). A modell bár érvényes minden membránpotenciál esetén, a különböző állapotok betöltöttsége és a kapuzási átmenetek kinetikája erősen feszültségfüggő, a membránpotenciál aktuális értéke így meghatározza az adott állapotba vezető lehetséges útvonalakat, illetve azok valószínűségeit is. Munkánk során felderítettük a *Shaker*-IR

elektrofiziológiailag „csendes”, azaz mérhető áram megjelenésével nem járó kapuzási átmeneteit az egyensúlyi inaktiváció és az inaktivációból való visszatérés folyamatai során. Mind az inaktiváció, mind az inaktivációból való visszatérés során a zárt-inaktivált (CI) állapotba történő belépés, illetve az abból való kilépés döntő fontosságú. Negatív membránpotenciálok esetén azt találtuk, hogy a *Shaker* csatorna a $C \rightarrow O \rightarrow OI \rightarrow CI$ útvonalon kerülhet a CI állapotba, másrészt az $OI \rightarrow CI$ átmenet nélkülözhetetlen feltétele az inaktivációból való visszatérésnek. Ezeket alátámasztották egyrészt azok a megfigyeléseink, melyek szerint az aktivációs kapu kinyílik olyan negatív membránpotenciálokon, amelyek a CI állapot kialakul. Másrészt az inaktivációból való visszatérést megakadályozza, ha az inaktivált csatornában az aktivációs kapu nyitott állapotban rögzítjük (tehát az OI állapot stabilizáljuk). Részletesebben kifejtve megfigyeléseinket azt találtuk, hogy a Cd^{2+} módosítja a T449A/V474C *Shaker-IR* csatornákat -90 mV-on olyan membránpotenciál mellett, ahol az egyensúlyi inaktiváció kialakul mérhető ionáram hiányában. Az intracellulárisan alkalmazott Cd^{2+} akkor képes módosítani az aktivációs kapu mögött elhelyezkedő 474-es pozícióban levő aminosavat és ezáltal gátolni az ionáramot, ha a csatorna aktivációs kapuja kinyílik. A T449A/V476C konstrukcióban pedig a 476C és H486 aminosavak között kialakuló Cd^{2+} -híd nyitott állapotban rögzíti az aktivációs kaput, ez a csatornát permanensen inaktivált állapotban tartja, még negatív membránpotenciálok esetén is, és megakadályozza az inaktivációból való visszatérést. Korábbi kísérletek eredményeként tudjuk, hogy a *Shaker* csatorna aktivációs és C-típusú inaktivációs kapui egymással csatoltak, mivel az aktivációs kapu nyitása elősegíti az inaktivációs kapu záródását^{32,58-60,66,67}. Ezt figyelembe véve eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy negatív membránpotenciálok esetén a *Shaker-IR* csatorna a $C \rightarrow O \rightarrow OI \rightarrow CI$ útvonalon keresztül jut a CI állapotba. A két kapu allosztérikus csatolásával kapcsolatos ismereteinket továbbá azzal a megfigyeléssel egészíthetjük ki, miszerint a nyitott állapotú aktivációs kapu képes az inaktivációs kaput non-konduktív (zárt) konformációban rögzíteni, ezáltal nem lehetséges az $OI \rightarrow CI$ átmenet.

5.9 A zárt állapotból bekövetkező inaktiváció különböző ioncsatornák esetén

A zárt állapotból történő inaktiváció ($C \rightarrow CI$ átmenet) lehetőségét számos ioncsatornában leírták, így feszültségfüggő nátrium-, kalcium- és káliumcsatornák esetén is, ahol ez az átmenet fiziológiás körülmények között is fontos eleme a csatornák inaktivációs kapuzásának^{230,231}. Mivel ezeknek a csatornáknak a szerkezete, valamint az inaktivációjuk mechanizmusa jelentősen különbözik a *Shaker-IR* csatorna felépítésétől, valamint C-típusú

inaktivációjától, nem meglepő, hogy az általunk javasolt kapuzási séma eltér a más csatornák esetében leírt irodalmi adatoktól.

Nav csatornában például számos tanulmány jellemezte mind kvantitatív, mind kvalitatív módszerekkel a zárt állapotból bekövetkező inaktivációt^{50,232}. A jelenség ezen fehérjékben szerkezetileg a III és IV doménekben található feszültség szenzorok külön-külön bekövetkező extracelluláris tér irányába történő elmozdulásához kötődik, amely a csatornák inaktivációjához vezet a pórus nyitása nélkül^{233,234}. A Nav csatornákkal ellentétben HCN („hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel” hiperpolarizáció által aktivált és ciklikus nukleotid által szabályozott csatorna csatornák) esetén egyetlen kapu felelős mind az aktiváció, mind az inaktiváció folyamatáért. A részlegesen aktivált, inaktiváció szempontjából permisszív állapotból bekövetkezhet az inaktiváció, így ebben a részlegesen nyitott állapotban az egyedüli kapu ismételt záródása eredményezheti a csatorna inaktivációját^{230,235}. Bakteriális KcsA csatornában a zárt állapotú inaktiváció a szelektivitási szűrő összeesése révén következik be^{37,38,59}, de a KcsA és K_V csatornák krisztallográfias módszerekkel meghatározott szerkezetei között megfigyelhető jelentős eltérések arra utalnak, hogy a C-típusú inaktiváció mechanizmusa különböző lehet ezen fehérjékben³⁴.

K_V csatornában a zárt állapotból létrejövő inaktiváció lehetősége az egyes altípusok esetén különbözik egymástól. A jelenséget leírták K_V4^{236,237}, K_V3^{200,231}, K_V11.1 (HERG „humán Ether-à-go-go-Related Gene”)^{238,239}, K_V2²⁴⁰ és K_V1.5 esetén⁵⁹. Ezen megfigyelések *Shaker* csatornákra való alkalmazhatóságát azonban megkérdőjelezi, hogy a *Shaker* inaktivációja több szempontból jelentősen eltérő. Például K_V4 csatornák inaktivációját nem befolyásolja az extracellulárisan alkalmazott TEA⁺²⁴¹, a magas külső K⁺ koncentráció ugyanakkor gyorsítja az inaktivációs kinetikát²³⁶. Ezek a *Shaker* csatorna esetén fordítva jellemzőek. Ezek, illetve egyéb fontos különbségek miatt vezették be K_V4 esetén az “A/C-típusú inaktiváció” elnevezést²³¹. Az A/C-típusú inaktiváció a C-típusú inaktivációval együtt fordul elő N-terminálisan csonkolt K_V1.5 csatornában²⁴². K_V11.1 (vagy másnéven HERG) csatornában a *Shaker*-hez hasonló C-típusú inaktiváció figyelhető meg, néhány különbséggel²⁴³. Egyrészt az inaktiváció és az inaktivációból való visszatérés gyorsabb időskálán zajlik le, mint *Shaker*-ben^{52,238}, másrészt pedig az inaktiváció nem kapcsolt közvetlenül az aktiváció feszültségfüggéséhez²³⁹.

A zárt állapotból bekövetkező inaktiváció lehetőségét korábban már leírták *Shaker*-IR csatornában is. TEVCF technikával kimutatták, hogy az ILT mutáns *Shaker* csatorna, pH=5 esetén^{201,202} képes a zárt állapotból közvetlenül inaktiválódni, viszont fiziológias pH mellett (pH=7,5) az inaktiváció a zárt állapotból már nem következik be. Ezeknek a kísérleteknek a

legfőbb korlátját az adja, hogy amennyiben az S4-es hélix három nem töltött aminosavát ILT aminosavakra mutáljuk, az alapvetően megváltoztatja a feszültség-szenzor és a pórusdomén közötti csatolás kooperativitását és megbontja az aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuk közötti fiziológiás kommunikációt, amit a G-V görbe jobbra tolódása és lassuló áramaktivációs kinetika is jelez ²⁴⁴. Így az ILT mutáció jelentősen befolyásolja magának a tanulmányozni kívánt C-típusú inaktivációnak a folyamatát is. A másik mutáció, amely mellett felvetették *Shaker* ioncsatornában a C→CI átmenet lehetőségét az L382I mutáció. A mutáció mellett egy olyan inaktivációs modellt írtak le, amely alapján a csatorna a *Shaker*-IR-rel ellentétben a négy mély zárt állapot bármelyikéből képes közvetlenül inaktiválódni ²⁴⁵. A 382-es pozíció az S4-S5 linkerén az S4 hélix aljához közel helyezkedik el, amely régió az aktivációs és inaktivációs kapuk közötti csatolás fontos eleme ¹⁵, ezáltal az L382I mutáció új lehetséges átmeneteket hozhat létre a zárt és zárt-inaktivált állapotok között. A C→CI átalakulás meglétét szintén felvetették T442A mutációt hordozó *Shaker*-IR csatornában is, amelyekben a szelektivitási szűrőben levő, a K⁺ szelektivitást alapvetően meghatározó TTVGYGD szekvencia (úgynevezett „signature” szekvencia) második treoninjának alaninra történő mutációját követően írtak le zárt állapotból létrejövő inaktivációt ⁵⁹. Ez a mutáció az ILT, valamint L382I mutációkhoz hasonlóan jelentősen megváltoztatja a csatorna kapuzási tulajdonságait, mivel a T442A mutánsban az aktivációs kapu nyitása nem vezet C-típusú inaktivációhoz, hanem inkább gátolja azt (inverz allosztérikus csatolás az aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuk között) ⁵⁹.

A fentebb bemutatott kísérletek során, ahol sikerült kimutatni a C→CI átmenetet *Shaker* csatornák esetén egyrészt a vad típusúhoz képest drámaian eltérő tulajdonságokkal rendelkező mutáns csatornákat (ILT, L382I és T442A) alkalmaztak, másrészt pedig a leírt konklúziókat alacsony hajtóerő melletti ionáram-mérésekre alapozták. Ezzel szemben mi a kísérletes rendszerünket két szempontból is továbbfejlesztettük. Egyrészt T449A/V474C és T449A/V476C mutációval rendelkező *Shaker* mutánsokat használtunk, amelyekben a természetes kapuzási folyamatok megőrződtek, így a kapuzási paraméterek mindkét általunk alkalmazott csatorna esetén összehasonlíthatók a vad típusú csatornák jellemzőivel (**15. és 20. ábrák**). Másrészt a kísérletek során mi közvetlenül az aktivációs kapu állapotát monitoroztuk vagy manipuláltuk a Cd²⁺ modifikáció segítségével. Ez hatékony módszer az aktivációs kapu nyitásának nyomon követésére ¹⁸⁵ és nyitott állapotban történő rögzítésére ^{23,187}. A 474C és 476C csatornában a Cd²⁺ ciszteinhez kötődése, valamint a Cd²⁺ által mediált fémhíd képződése szenzitív és specifikus kémiai kölcsönhatásokon alapul. Ezáltal a kísérletes stratégiának köszönhetően képesek voltunk felderíteni az elektrofiziológiailag csendes átmeneteket, továbbá

az általunk alkalmazott gyorsperfúziós rendszer lehetővé tette a Cd^{2+} modifikációs és keresztkövetési esszék pontos elvégzését.

5.10. A T449A/V474C *Shaker*-IR csatorna esetén kapott kísérletes eredmények kritikus elemzése, a $\text{C} \rightarrow \text{CI}$ átmenet lehetőségének vizsgálata negatív membránpotenciálok esetén

Korábban kimutatták, hogy a *Shaker*-IR csatornában a 474-es pozícióban levő cisztein Cd^{2+} általi módosításának mértéke jól korrelál a csatorna nyitási valószínűségével (P_0), vagyis az aktivációs kapu annak nyitásától függő módon teszi hozzáférhetővé a mögötte elhelyezkedő 474C-t a Cd^{2+} számára ²². Mivel a P_0 -V kapcsolat folytonos függvénnyel jellemezhető, az RCF értékéből levont következtetések megbízhatóságának igazolására kísérleteink megkezdése előtt megfelelő negatív kontrollt kellett találnunk (**17. ábra**). Bemutattuk, hogy a P_1 és P_2 között -120 mV-os tartófeszültségen magas koncentrációban (**18A ábra** esetén használt koncentráció 10-szeresének megfelelő, $200 \mu\text{M}$ -ban) alkalmazott Cd^{2+} igen hosszú (20 s-os) expozíciója esetén is 1 volt az RCF értéke (**17B, E ábrák**). Ezáltal a **17B ábrán** bemutatott kísérlet jó negatív kontrollként szolgál a **18. ábrán** bemutatott eredmények értelmezéséhez. Bár zárt állapotban a *Shaker*-IR csatornák nagyon kicsi, ám mérhető konduktanciával rendelkeznek (amelynek nagysága 16 fs alatti ²⁴⁶), a **17B ábrán** bemutatott negatív kontroll méréseink arra utalnak, hogy ez a konduktancia -120 mV-on nem elégséges a 474C Cd^{2+} által történő szignifikáns módosításához.

A **17. és 18. ábrákon** bemutatott kísérletek és a fenti elemzés alapján az RCF csökkenését az aktivációs kapu mögött elhelyezkedő ciszteinek Cd^{2+} által történő módosításának tulajdonítjuk. A Cd^{2+} és a ciszteinek közötti specifikus kölcsönhatás meglétét az a megfigyelés is megerősíti, hogy a Cd^{2+} magasabb koncentrációja az RCF nagyobb mértékű csökkenését eredményezte, amint azt a cisztein és Cd^{2+} közötti látszólagosan-elsőrendű kémiai reakció esetén várhatjuk (**18C ábra**). Emellett a tartófeszültség ciklikusan ismételt rövid, -90 mV-ra vagy -80 mV-ra történő változtatása Cd^{2+} jelenlétében az IF hasonló mértékű növekedését eredményezi (**19C, D ábrák**), mint Cd^{2+} egyszeri, hosszú ideig történő applikációja (**18. ábra**). Ez az eredmény annak kizárását is elősegíti, hogy a Cd^{2+} hosszabb, egyszeri alkalmazása során esetlegesen egy nem-specifikus kölcsönhatás vezet a megfigyelt RCF redukcióhoz. Összegezve a **17., 18. és 19. ábrákon** bemutatott eredményeinket megállapíthatjuk, hogy kísérletes rendszerünkben a 474C és Cd^{2+} közötti specifikus kölcsönhatáson alapuló, gyorsperfúziós rendszer segítségével kivitelezett Cd^{2+} módosítási

esszé megfelelő eszköz az aktivációs kapu nyitásának detektálására az RCF csökkenésének meghatározása segítségével.

A **18. ábrán** bemutatott adatok alapján látható, hogy az RCF értéke minden vizsgált membránpotenciál esetén 0-tól különbözik. Ez egyrészt azt jelentheti, hogy az egyensúlyi inaktivációban részt vevő csatornáknak csak egy része van olyan állapotban, amelyben képesek kölcsönhatni a Cd^{2+} -mal, másrészt viszont arra is utalhat, hogy bár minden csatorna hozzáférhető Cd^{2+} számára, a Cd^{2+} nem módosítja az összes csatornát a 20 s-os alkalmazás időtartama alatt. Utóbbi esetben az RCF értékének csökkennie kell a Cd^{2+} koncentrációjának növekedése esetén. A **18C ábrán** bemutatott adatainkból ez következik, a Cd^{2+} koncentrációjának emelése az RCF jelentősebb csökkenését okozza. A Cd^{2+} megnövekedett kumulatív expozíciós időt eredményező sorozatos, rövid applikációja nagyobb mértékű áramcsökkenéshez vezetett nagyobb ciklusszám esetén (megnövekedett IF, **19. ábra**), amely szintén alátámasztja feltevésünket, amely szerint a csatornák Cd^{2+} számára hozzáférhető állapotban vannak, amikor az egyensúlyi inaktiváció végbemegy. A várakozás alapján mind az IF, mind az RCF paraméter értéke függ a membránpotenciál nagyságától, amelyet a **18. és 19. ábrákon** mutatunk be.

Kísérleteink egyértelműen azt mutatják, hogy a *Shaker*-IR csatornák szignifikáns hányada rendelkezik nyitott aktivációs kapuval és kölcsönhat Cd^{2+} -mal olyan negatív membránpotenciálok, amelyek mellett az egyensúlyi inaktiváció végbemegy. Egyszerű értelmezés szerint ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy -90 mV-on néhány csatorna kinyit, majd inaktiválódik és ezek azok a csatornák, amelyek módosíthatók Cd^{2+} -mal. Ezek alapján a csatornák nyitása megelőzi az inaktivációt és az egyensúlyi inaktivációt eredményező kapuzási lépések a $\text{C} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{OI}$ útvonalon haladnak. Mivel irodalmi adatok alapján mind az O, mind pedig az OI állapotú csatornák 474C-je módosítható Cd^{2+} -mal¹⁸⁶, így nem zárható ki annak a lehetősége, hogy az RCF csökkenését -90 mV-on a Cd^{2+} $\text{C} \rightarrow \text{CI} \rightarrow \text{OI}$ átmeneteken keresztülment csatornákkal való kölcsönhatása eredményezi. Véleményünk szerint azonban az utóbbi lehetőség kevésbé valószínű két ok miatt is. Egyrészt az OI állapotú csatornák Cd^{2+} általi módosítása körülbelül 20-szor lassabb az O állapotban levő csatornákhöz viszonyítva¹⁸⁶. A másik érv pedig egy nemrég megjelent tanulmányból következik, amely szerint *Shaker* csatornában az aktivációs kapu nyitása a C-típusú inaktivációs kapu zárását eredményezi, így az OI állapotba jutáshoz vezető elsődleges átmenet az $\text{O} \rightarrow \text{OI}$ átalakulás⁵⁹. Ezek alapján a Cd^{2+} modifikáció valószínűleg sokkal inkább az OI-t megelőző O állapotban történik. Ez több *Shaker* konstrukcióban is igaz lehet, így T449A esetén is, ahol az inaktiváció folyamatát a C-típusú inaktiváció dominálja²⁰³.

5.11 A T449A/V476C *Shaker*-IR csatorna esetén kapott kísérletes eredmények kritikus elemzése, az OI→O átmenet lehetőségének vizsgálata negatív membránpotenciálok esetén

Az egyéb kapuzási átmenetekhez képest viszonylag keveset tudunk a C-típusú inaktivációból való visszatéréshez vezető útvonalról és a folyamat során végbemenő molekuláris átrendeződésekről. A hagyományos forgatókönyv szerint elnyújtott depolarizáció során a C-típusú inaktivációs kapu záródik (OI állapot), majd a negatív membránpotenciálra való visszatérés indukálja az aktivációs kapu záródását, az OI→CI átmenetet. Ezt követően a megfelelő ideig tartó, kellően negatív membránpotenciál melletti repolarizációs periódus során a CI állapotú csatornák visszatérnek az inaktivációból, inaktivációs kapujuk kinyílik, így újból a zárt állapotba (C) kerülnek (**2. ábra**). Az inaktivációból való visszatérés folyamán a sebességhatározó lépés a CI→C átmenet, mivel *Shaker* esetén az OI→CI átalakulás nagyon gyors, ms-os nagyságrendű⁵⁸, míg az inaktivációból történő visszatérés másodperces időskálán megy végbe. A korábbi megfigyelésünk, amely szerint az inaktív állapotban levő csatornák aktivációs kapuja viszonylag gyorsan záródik (a folyamat időállandója 23 ms –120 mV-on,⁵⁸) nem zárja ki nyitott aktivációs kapuval rendelkező csatornák esetén az inaktivációból való visszatérés lehetőségét.

Amennyiben az aktivációs kapu záródása nélkülözhetetlen a visszatéréshez, a nyitott állapotban rögzített aktivációs kapuval rendelkező csatornák inaktív állapotban maradnak, vagyis az inaktivációból való visszatérésük gátolt. Ezt a jelenséget demonstráltuk *Shaker*-IR esetén a **22. ábrán**. Ahogy az az ábrán látható, az aktivációs kapu nyitott állapotban történő rögzítése inaktivált csatornában (OI állapot) egyszeri 1 s-os Cd²⁺ applikációval vagy 200 ms hosszúságú Cd²⁺ pulzusok ismételt alkalmazásával, teljes mértékben megakadályozta a csatornák inaktivációból való visszatérését. Kumulált Cd²⁺ expozíció esetén a csúcsáramok **22C ábrán** látható csökkenése elsőfokú, egy exponenciális taggal leírható csökkenést mutatott, amely a Cd²⁺ és a T449A/V476C csatornák közötti specifikus kölcsönhatás meglétére utal. Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az inaktivációból való visszatérés nem lehetséges nyitott állapotban rögzített aktivációs kapu mellett.

A fent bemutatott következtetésünk az ionáram Cd²⁺ applikáció hatására bekövetkező csökkenésén alapult (**22. ábra**). A divalens kationokról ismert, hogy gátolják az ioncsatornákat, így a Ba²⁺ gátolja a *Shaker*-t és más K_V csatornákat^{247,248}, továbbá a Cd²⁺-ről is kimutatták, hogy több ioncsatornát is képes gátolni^{249,250}. Emiatt a következtetésünk alátámasztására

nélkülözhetetlen volt annak igazolása, hogy a Cd^{2+} nem gátolja a 476-os pozícióban a kritikus ciszteint nem tartalmazó *Shaker*-IR csatornát amit a **21C, D ábrákon** be is mutattunk. Emellett azt is bemutattuk, hogy a repetitív depolarizáló pulzusok közötti 60 s hosszúságú ipi elégséges a cisztein mutációt hordozó csatornák esetén az inaktivációból való teljes visszatéréshez (**21A, B ábrák**). Ezekből következik, hogy a **22. ábrán** látható áramcsökkenést nem magyarázhatja az sem, hogy túlságosan rövid ideig vártunk -120 mV-os tartófeszültségen a pulzusok között. A fentiek alapján az áram csökkenése egyértelműen abból következik, hogy a nyitott aktivációs kapuval rendelkező OI állapotú csatornák nem képesek visszatérni az inaktivációból.

Az aktivációs kapu nyitott konfigurációban való rögzítését korábban részletesen leírták a *Shaker*-IR csatornában ²³ a 476-os cisztein és az egyik szomszédos alegység 486-as pozíciójú natív hisztidinje közötti Cd^{2+} -híd kialakításával. Az inaktiválódó T449A/V476C *Shaker*-IR konstrukcióban a H486 és 476C aminosavak közötti Cd^{2+} -híd kialakulásának igazolására megváltoztattuk az intracelluláris oldat pH-ját. Alacsony, 5,3-as intracelluláris pH esetén, amikor a hisztidinek protonáltak ($\text{pK}_a \sim 6.0$), a Cd^{2+} nem volt képes az ionáramok módosítására (**23B, C ábrák**). Ez alátámasztja a Cd^{2+} , H486 és 476C közötti specifikus kölcsönhatást, ami a Cd^{2+} -híd kialakulásához, ezáltal az aktivációs kapu nyitott állapotban való rögzítéséhez vezet.

Megfigyeléseink alapján megállapítható, hogy az aktivációs kapu záródása az inaktivációból való visszatérés szükséges előfeltétele és negatív membránpotenciálok esetén a kapuzási átmenetek az $\text{O} \rightarrow \text{OI} \rightarrow \text{CI} \rightarrow \text{C}$ átalakulások sorrendjében történnek. Ezen séma alapján egy intracellulárisan alkalmazott, nyitott csatornákat blokkoló vegyület, ami megakadályozza az aktivációs kapu záródását, lelassíthatja és késleltetheti a csatorna inaktivációból való visszatérését. A *Shaker* csatorna kapuzására általunk javasolt séma összhangban van a Nav csatornákra korábban leírtakkal, miszerint az inaktivációból történő visszatérést meg kell előznie a csatorna aktivációs kapujának bezáródása révén létrejövő deaktivációjának ²³².

5.12 Általános összefoglalás

A dolgozatban bemutatott kísérletek segítségével a K_v csatornák kapuzásának finomhangolását befolyásoló két tényező szerepét vizsgáltuk. Az egyik tényező a sejtmembránban található koleszterin, amelyről már korábban kimutatták, hogy befolyásolja a K_v ioncsatornák aktivációs kapuzását, viszont eddig nem tisztázták, hogy a koleszterin ezt pontosan milyen, az ioncsatornán belüli támadásponton keresztül valósítja meg. A dolgozatban vizsgált másik kérdéskör a negatív membránpotenciálok melletti kapuzási átmenetek vizsgálata volt. Ezen kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy egyrészt a C-típusú inaktiváció

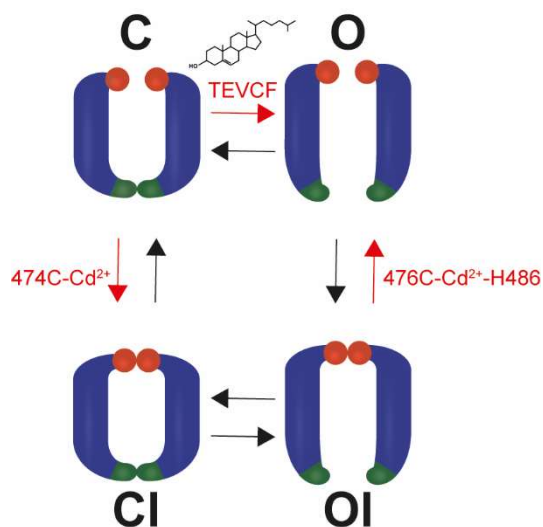
végbemenetelének szükséges feltétele-e az aktivációs kapu nyitása, másrészt az inaktivációból való visszatérés folyamatához szükség van-e az aktivációs kapu bezáródására.

A koleszterin K_V ioncsatornákon belüli támadáspontjának meghatározása, valamint a negatív membránpotenciálok melletti átmenetek direkt vizsgálata nem lehetséges az ionáram-méréseken alapuló patch-clamp technika segítségével. Egyrészt a patch-clamp mérések esetén ugyanis hagyományos körülmények között nem kapunk információt a VSD kapuzás során bekövetkező mozgásairól az ionáramok mérésével egyidőben. Másrészt a negatív membránpotenciálokon történő ionárammérések jelentős hibát hordoznak az ilyen membránpotenciálok melletti alacsony hajtóerőből és alacsony csatornanyitási valószínűségekből fakadóan. Így azért, hogy a disszertáció célkitűzéseiben megfogalmazott két kérdésre pontos választ tudjunk adni, új módszereket kellett alkalmaznunk, amelyek révén új megközelítésből vizsgálhattuk a K_V ioncsatornák kapuzását.

A disszertáció első felében bemutatott TEVCF technika az ionáramok mérése mellett lehetővé tette számunkra a VSD mozgásának nyomonkövetését a teljes kapuzási folyamat során (24. ábra). A módszert használva így a koleszterin klasszikus elektrofiziológiai paraméterekre gyakorolt hatásai mellett meg tudtuk határozni annak csatornán belüli elsődleges célpontját (VSD, PD vagy a két domén közti csatolási apparátus). Eredményeink alapján a koleszterin fő támadáspontja maga a PD, nem pedig a VSD vagy a csatolási apparátus, mind a lineáris kapuzási modellnek megfelelően kapuzó $K_V1.3$, mind pedig a komplex kapuzási modellel leírható $K_V10.1$ esetén.

A disszertáció második részében bemutatott kísérleteink során az általunk megtervezett feszültségprotokollok és cisztein modifikációs stratégiák egy új kombinációját használtuk a *Shaker* ioncsatorna negatív membránpotenciálok mellett bekövetkező, egyensúlyi inaktivációját jellemző kapuzási sémájának leírására, valamint az inaktivációból való visszatérés előfeltételeinek meghatározására. A Cd^{2+} , illetve az általunk pontmutációval bevitt ciszteinek között létrejövő specifikus kölcsönhatások lehetővé tették számunkra az aktivációs kapu nyitásának detektálását (474C), illetve annak rögzítését (476C) negatív membránpotenciálok mellett is (24. ábra). Eredményeinket összegezve, az egyensúlyi inaktiváció kialakulásának legvalószínűbb útvonala a $C \rightarrow O \rightarrow OI \rightleftharpoons CI$ átalakulás, következtetésünk az, hogy nem a direkt $C \rightarrow CI$ átmenet vezet az egyensúlyi inaktiváció kialakulásához *Shaker* ioncsatornában. Emellett az inaktivációból való visszatéréshez nélkülözhetetlen az aktivációs kapu záródása, azaz az $OI \rightarrow CI$ átmenet. Ebből az a következtetés is levonható, hogy a direkt $OI \rightarrow O$ átmenet sem lehetséges negatív membránpotenciálon. Legfontosabb következtetésünk az, hogy az aktivációs kapu aktuális helyzete kiemelten fontos

az egyensúlyi inaktiváció és az inaktivációból történő visszatérés folyamatainak szabályozásában.



24. ábra A disszertációban bemutatott kísérletek során alkalmazott speciális technikák

A szterolok ioncsatornán belüli támadáspontjának meghatározására a kételektródás voltage-clamp fluorimetriás technikát (TEVCF) alkalmaztuk, amely a hagyományos patch-clamp technikával szemben, az ionáramok mérése mellett képes a feszültségszenzor működését is nyomonkövetni a kapuzási folyamat során. Következtetéseinket, miszerint a pórusdomén az ioncsatornán belüli fő célpontja a membránszteroloknak, főleg az egyensúlyi aktivációs paraméterek, illetve az áram és a fluoreszcens jel aktivációs kinetikájának meghatározásával vontuk le. Ezért az egyszerűség kedvéért a módszert, illetve a koleszterint csak a nyitási lépést reprezentáló felső piros nyílnál tüntettük fel. Valójában a szterolok az összes kapuzási lépést képesek modulálni, illetve a TEVCF technikával egy megfelelő helyre elhelyezett cisztein pontmutációval nemcsak a feszültségszenzor, hanem akár a pórus, vagy a C-típusú inaktivációs kapu mozgását is tudnánk tanulmányozni. A disszertáció második részében egyrészt a direkt C→CI átmenet lehetőségét vizsgáltuk T449A/V474C *Shaker*-IR csatornában (bal oldali piros nyíl), másrészt a direkt OI→O átmenet lehetőségét T449A/V476C csatornában (jobb oldali piros nyíl) negatív membránpotenciálok mellett. A pontmutációval bevitt ciszteinek és a Cd²⁺ közötti specifikus kémiai reakció az általunk létrehozott sajátos felépítésű pulzusprotokollok mellett biztosította azt, hogy a negatív membránpotenciálokon jelen levő alacsony nyitási valószínűség és kis hajtóerő mellett is szelektíven tudjuk tanulmányozni ezeknek a kapuzási átmeneteknek a lehetőségét.

Eredményeink motivációt nyújthatnak a koleszterin-membránfehérje kölcsönhatások további tanulmányozásához, illetve perspektivikusak a későbbi szerkezet-funkció és farmakológiai vizsgálatok számára. Megfigyeléseink az indirekt koleszterin hatások és az azok háttérben álló molekuláris célpontok felderítésének fontosságát hangsúlyozzák. Ezek megismerése hozzájárulhat több olyan betegség patomechanizmusának mélyebb megértéséhez, amelyekben az egyik fontos eltérés a sejtmembránban található koleszterin koncentrációjának növekedése vagy megváltozása. Ilyen, a szterolok koncentrációjának eltéréseivel járó kórképek közé tartoznak különböző tumorer, anyagcsere, neurodegeneratív és immunológiai betegségek, illetve maga az öregedés folyamata is ^{85,87-89 85,87-89,181-184}. A negatív membránpotenciálon végbemenő kapuzási átmenetek lehetőségének vizsgálata szintén biológiai szempontból is

jelentős, ugyanis mind az egyensúlyi inaktiváció, mind az inaktivációból történő visszatérés jelentősen meghatározza a potenciálisan aktiválható csatornák számát, ami a sejtek ingerelhetőségének egyik meghatározó tényezője.

6. Összefoglalás

Annak ellenére, hogy a feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_V) kapuzásának strukturális alapjai, főbb lépesei és szabályozásának alapvető elemei ismertek, a kapuzási folyamat finomhangolását biztosító több tényező a megfelelő módszerek hiányában ezidáig feltáratlan maradt. Munkánk során ezért a K_V csatornák aktivációs és C-típusú inaktivációs kapuzásának finomhangolását vizsgáltuk meg két fő kérdés mentén, új módszereket alkalmazva.

Kimutattuk, hogy a membrán koleszterin és a 7-dehidrokoleszterin tartalmának emelése jelentősen módosítja a $K_{V1.3}$ és a $K_{V10.1}$ csatornák feszültségfüggő kapuzását jellemző egyensúlyi és kinetikai paramétereket. A kételektrodás voltage-clamp fluorimetria technikát alkalmaztuk annak kiderítésére, hogy a membrán szterol koncentrációjának növelése az ioncsatorna feszültség szenzor doménjére (VSD) fejt-e ki hatását. Ezzel a technikával követni tudjuk a VSD mozgását az ionáram-mérésekkel egyidőben a kapuzási folyamat alatt a hozzá kapcsolt molekula fluoreszcencia intenzitásának változásán keresztül. Eredményeink azt mutatták, hogy a membrán szteroloknak nincs közvetlen hatása a VSD-re. A VSD és a pórus domén (PD) közötti csatolási apparátusra gyakorolt hatást többek között azzal zártuk ki, hogy a két vizsgált ioncsatorna esetén VSD és PD közötti csatolás különböző, $K_{V1.3}$ esetén szoros, míg $K_{V10.1}$ esetén e kapcsolat laza, a membrán szterolok hatása PD működésére viszont hasonló a két csatornában. Következtetésünk tehát, hogy a membrán szterolok elsődleges ioncsatornán belüli célpontja a PD, amit a szterolok hatása a csatorna vezetőképességre is megerősít.

A PD egyik kitüntetett szerkezeti eleme az aktivációs kapu (A-kapu), melynek működését állapotfüggő cisztein modifikációs és keresztkövetési esszék alkalmazásával vizsgáltuk *Shaker-IR* csatornán, negatív membránpotenciálokon. Ez lehetőséget biztosít arra, hogy az A-kapu kinyílását kimutassuk a PD üregébe jutott Cd^{2+} és az ide stratégiaileg beépített cisztein közötti kölcsönhatáson keresztül, ami a csatornán átfolyó áram csökkenésében nyilvánul meg. A módszerrel kimutattuk, hogy a csatorna A-kapujának kinyílása megelőzi a csatorna inaktivációját negatív membránpotenciálokon, azaz az egyensúlyi inaktiváció kialakulása során. A *Shaker-IR* csatornában a 476 pozícióban elhelyezett cisztein és egy a szomszédos alegységben található hisztidin közötti Cd^{2+} -híd a csatorna A-kapuját nyitott állapotban rögzíti. Kísérleteink során az inaktivált csatornák A-kapuját Cd^{2+} -híddal nyitott állapotban rögzítettük, ekkor a csatorna nem tér vissza az inaktivált állapotából tartós, -120 mV-os hiperpolarizáció mellett sem. Az A-kapu tehát kontrollálja azon negatív membránpotenciálokon végbemenő kapuzási átmeneteket (egyensúlyi inaktiváció, inaktivációból történő visszatérés), melyek a rendelkezésre álló káliumcsatornák számának kritikus meghatározói.

7. Summary

Although the structural foundations, main steps, and essential elements of the gating of voltage-gated potassium channels (K_V) are known, several factors that ensure fine-tuning of the gating process have so far remained unexplored in the absence of proper methods. In our work, therefore, we examined the fine-tuning of activation and C-type inactivation gating of K_V channels along two main issues applying modern biophysical methods.

We have shown that increasing the cholesterol and 7-dehydrocholesterol content of the cell membrane significantly modifies the steady-state and kinetic parameters characterizing the voltage-dependent gating of K_V1.3 and K_V10.1 channels. We used the two-electrode voltage-clamp fluorometry technique to determine whether increasing the sterol concentration of the membrane affects the voltage sensor domain (VSD) of the ion channel. With this technique, the movement of the VSD can be tracked simultaneously with ion current measurements during the gating process through changes in the fluorescence intensity of the fluorophore attached to the top of the VSD. Our results showed that membrane sterols exert no direct effects on the VSD. Effects on the coupling apparatus between VSD and the pore domain (PD) were also ruled out by the fact that although the coupling between VSD and PD is different in the case of the two ion channels studied, i.e. it is tight in K_V1.3 and loose in K_V10.1, membrane sterols had similar effects on PD function in the two channels. Therefore we concluded that the PD is the primary target of membrane sterols within the ion channels, which was also confirmed by the effects of sterols on channel conductivities.

One of the distinguished structural elements of the PD is the activation gate (A-gate), the operation of which we investigated using state-dependent cysteine modification and cross-linking assays in *Shaker*-IR channels at negative membrane potentials. This method makes it possible to detect the opening of the A-gate through the interaction between the Cd²⁺ entering the cavity of the PD and a cysteine strategically introduced here, which is manifested in a decrease in the current flowing through the channel. With this method, we showed that the opening of the A-gate precedes the inactivation of the channel at negative membrane potentials, i.e. during the development of steady-state inactivation. In the *Shaker*-IR channel, a Cd²⁺ bridge between the introduced cysteine at position 476 and a histidine of the adjacent subunit locks the A-gate of the channel in the open state. In our experiments, the A-gate of inactivated channels was locked in the open state with a Cd²⁺ bridge, subsequently, the channel did not recover from inactivation even at a prolonged hyperpolarization of –120 mV. Therefore, the A-gate controls the gating transitions (steady-state inactivation, recovery from inactivation) that are critical determinants of the number of available potassium channels at negative membrane potentials.

8. Irodalomjegyzék

- 1 MacKinnon, R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235 (1991).
- 2 Doyle, D. A. *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77 (1998).
- 3 Long, S. B., Campbell, E. B. & Mackinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897-903, doi:10.1126/science.1116269 (2005).
- 4 Gutman, G. A. *et al.* International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508, doi:10.1124/pr.57.4.10 (2005).
- 5 Pourrier, M., Schram, G. & Nattel, S. Properties, expression and potential roles of cardiac K⁺ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* **194**, 141-152, doi:10.1007/s00232-003-2034-8 (2003).
- 6 Wang, J. W. & Wu, C. F. In vivo functional role of the Drosophila hyperkinetic beta subunit in gating and inactivation of Shaker K⁺ channels. *Biophys J* **71**, 3167-3176, doi:10.1016/S0006-3495(96)79510-3 (1996).
- 7 Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal* **66**, 1061-1067 (1994).
- 8 Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. & MacKinnon, R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-48 (2001).
- 9 Neyton, J. & Miller, C. Discrete Ba²⁺ block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Gen Physiol* **92**, 569-586 (1988).
- 10 Neyton, J. & Miller, C. Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J Gen Physiol* **92**, 549-567 (1988).
- 11 MacKinnon, R. & Miller, C. Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Gen Physiol* **91**, 335-349, doi:10.1085/jgp.91.3.335 (1988).
- 12 Swartz, K. J. The scorpion toxin and the potassium channel. *Elife* **2**, e00873, doi:10.7554/eLife.00873 (2013).
- 13 Catterall, W. A. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* **67**, 915-928, doi:10.1016/j.neuron.2010.08.021 (2010).
- 14 Noda, M. *et al.* Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121-127 (1984).
- 15 Long, S. B., Campbell, E. B. & Mackinnon, R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**, 903-908, doi:10.1126/science.1116270 (2005).
- 16 Tomczak, A. P. *et al.* A new mechanism of voltage-dependent gating exposed by KV10.1 channels interrupted between voltage sensor and pore. *J Gen Physiol* **149**, 577-593, doi:10.1085/jgp.201611742 (2017).
- 17 Whicher, J. R. & MacKinnon, R. Structure of the voltage-gated K(+) channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science* **353**, 664-669, doi:10.1126/science.aaf8070 (2016).
- 18 Van Slyke, A. C. *et al.* Mutations within the S4-S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K⁺ channels. *Biophys J* **99**, 2841-2852, doi:10.1016/j.bpj.2010.08.030 (2010).
- 19 Lorinczi, E. *et al.* Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing and pore domains. *Nat Commun* **6**, 6672, doi:10.1038/ncomms7672 (2015).
- 20 Chen, X., Wang, Q., Ni, F. & Ma, J. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**, 11352-11357 (2010).
- 21 Bezanilla, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**, 555-592 (2000).

- 22 del Camino, D. & Yellen, G. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron* **32**, 649-656, doi:10.1016/s0896-6273(01)00487-1 (2001).
- 23 Webster, S. M., Del Camino, D., Dekker, J. P. & Yellen, G. Intracellular gate opening in Shaker K+ channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature* **428**, 864-868, doi:10.1038/nature02468 (2004).
- 24 Yellen, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* **31**, 239-295, doi:10.1017/s0033583598003448 (1998).
- 25 Kurata, H. T. & Fedida, D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* **92**, 185-208, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2005.10.001 (2006).
- 26 Hoshi, T., Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533-538 (1990).
- 27 MacKinnon, R., Aldrich, R. W. & Lee, A. W. Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **262**, 757-759 (1993).
- 28 Hashimoto, Y. *et al.* Changes in the inactivation of rat Kv1.4 K(+) channels induced by varying the number of inactivation particles. *J Biol Chem* **275**, 9358-9362, doi:10.1074/jbc.275.13.9358 (2000).
- 29 Antz, C. *et al.* Control of K+ channel gating by protein phosphorylation: structural switches of the inactivation gate. *Nat Struct Biol* **6**, 146-150, doi:10.1038/5833 (1999).
- 30 Choi, K. L., Aldrich, R. W. & Yellen, G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5092-5095, doi:10.1073/pnas.88.12.5092 (1991).
- 31 Morales, M. J., Castellino, R. C., Crews, A. L., Rasmusson, R. L. & Strauss, H. C. A novel beta subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel alpha subunits. *J Biol Chem* **270**, 6272-6277, doi:10.1074/jbc.270.11.6272 (1995).
- 32 Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M. & Perozo, E. Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature* **466**, 203-208, doi:10.1038/nature09153 (2010).
- 33 Hoshi, T. & Armstrong, C. M. C-type inactivation of voltage-gated K+ channels: pore constriction or dilation? *J Gen Physiol* **141**, 151-160, doi:10.1085/jgp.201210888 (2013).
- 34 Matthies, D. *et al.* Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.37558 (2018).
- 35 Pau, V., Zhou, Y., Ramu, Y., Xu, Y. & Lu, Z. Crystal structure of an inactivated mutant mammalian voltage-gated K(+) channel. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 857-865, doi:10.1038/nsmb.3457 (2017).
- 36 Pless, S. A., Galpin, J. D., Niciforovic, A. P., Kurata, H. T. & Ahern, C. A. Hydrogen bonds as molecular timers for slow inactivation in voltage-gated potassium channels. *Elife* **2**, e01289, doi:10.7554/eLife.01289 (2013).
- 37 Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Chakrapani, S. & Perozo, E. A multipoint hydrogen-bond network underlying KcsA C-type inactivation. *Biophys J* **100**, 2387-2393, doi:10.1016/j.bpj.2011.01.073 (2011).
- 38 Cuello, L. G., Cortes, D. M. & Perozo, E. The gating cycle of a K(+) channel at atomic resolution. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.28032 (2017).
- 39 Ostmeyer, J., Chakrapani, S., Pan, A. C., Perozo, E. & Roux, B. Recovery from slow inactivation in K+ channels is controlled by water molecules. *Nature* **501**, 121-124, doi:10.1038/nature12395 (2013).
- 40 Panyi, G., Sheng, Z. F., Tu, L. W. & Deutsch, C. C-type inactivation of a voltage-gated K+ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophysical Journal* **69**, 896-904 (1995).
- 41 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. *Receptors & channels* **1**, 61-71 (1993).
- 42 Baukrowitz, T. & Yellen, G. Modulation of K+ current by frequency and external [K+]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* **15**, 951-960 (1995).
- 43 Baukrowitz, T. & Yellen, G. Use-Dependent Blockers and Exit Rate of the Last Ion from the Multi-Ion Pore of a K+ Channel *Science* **271**, 653-656 (1996).

- 44 Grissmer, S. & Cahalan, M. D. Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *J Gen Physiol* **93**, 609-630, doi:10.1085/jgp.93.4.609 (1989).
- 45 Perez-Cornejo, P. H⁺ ion modulation of C-type inactivation of Shaker K⁺ channels. *Pflugers Arch* **437**, 865-870 (1999).
- 46 Deutsch, C. & Lee, S. C. Modulation of K⁺ currents in human lymphocytes by pH. *Journal of Physiology (London)* **413**, 399-413 (1989).
- 47 Dodson, P. D. & Forsythe, I. D. Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci* **27**, 210-217, doi:10.1016/j.tins.2004.02.012 (2004).
- 48 Gonzalez, C. *et al.* K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol* **2**, 2087-2149, doi:10.1002/cphy.c110047 (2012).
- 49 Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 449-472, doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004717 (1952).
- 50 Bean, B. P. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* **8**, 451-465, doi:10.1038/nrn2148 (2007).
- 51 Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *J Physiol* **590**, 2591-2599, doi:10.1113/jphysiol.2011.224212 (2012).
- 52 Smith, P. L., Baukrowitz, T. & Yellen, G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**, 833-836, doi:10.1038/379833a0 (1996).
- 53 Panyi, G., Varga, Z. & Gaspar, R. Ion channels and lymphocyte activation. *Immunology letters* **92**, 55-66, doi:10.1016/j.imlet.2003.11.020 (2004).
- 54 Perez-Garcia, M. T., Ciudad, P. & Lopez-Lopez, J. R. The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **314**, C27-C42, doi:10.1152/ajpcell.00136.2017 (2018).
- 55 Villalonga, N. *et al.* Immunomodulation of voltage-dependent K⁺ channels in macrophages: molecular and biophysical consequences. *J Gen Physiol* **135**, 135-147, doi:10.1085/jgp.200910334 (2010).
- 56 MacDonald, P. E. & Wheeler, M. B. Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* **46**, 1046-1062, doi:10.1007/s00125-003-1159-8 (2003).
- 57 Hoshi, T., Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547-556, doi:10.1016/0896-6273(91)90367-9 (1991).
- 58 Panyi, G. & Deutsch, C. Cross talk between activation and slow inactivation gates of Shaker potassium channels. *J Gen Physiol* **128**, 547-559, doi:10.1085/jgp.200609644 (2006).
- 59 Labro, A. J., Cortes, D. M., Tilegenova, C. & Cuello, L. G. Inverted allosteric coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 5426-5431, doi:10.1073/pnas.1800559115 (2018).
- 60 Cuello, L. G. *et al.* Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels. *Nature* **466**, 272-275, doi:10.1038/nature09136 (2010).
- 61 Pardo, L. A. *et al.* Extracellular K⁺ specifically modulates a rat brain K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2466-2470, doi:10.1073/pnas.89.6.2466 (1992).
- 62 Rasmusson, R. L. *et al.* Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ Res* **82**, 739-750, doi:10.1161/01.res.82.7.739 (1998).
- 63 Ray, E. C. & Deutsch, C. A trapped intracellular cation modulates K⁺ channel recovery from slow inactivation. *J Gen Physiol* **128**, 203-217, doi:10.1085/jgp.200609561 (2006).
- 64 Levy, D. I. & Deutsch, C. Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys J* **70**, 798-805, doi:10.1016/S0006-3495(96)79619-4 (1996).
- 65 Levy, D. I. & Deutsch, C. A voltage-dependent role for K⁺ in recovery from C-type inactivation. *Biophys J* **71**, 3157-3166, doi:10.1016/S0006-3495(96)79509-7 (1996).
- 66 Ogielska, E. M. & Aldrich, R. W. Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation. *J Gen Physiol* **113**, 347-358, doi:10.1085/jgp.113.2.347 (1999).

- 67 Sadovsky, E. & Yifrach, O. Principles underlying energetic coupling along an allosteric communication trajectory of a voltage-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19813-19818, doi:10.1073/pnas.0708120104 (2007).
- 68 Fantini, J. & Barrantes, F. J. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front Physiol* **4**, 31, doi:10.3389/fphys.2013.00031 (2013).
- 69 Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P. & Slotte, J. P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* **41**, 66-97 (2002).
- 70 Porter, F. D. Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *European journal of human genetics : EJHG* **16**, 535-541, doi:10.1038/ejhg.2008.10 (2008).
- 71 Steck, T. L. & Lange, Y. Transverse distribution of plasma membrane bilayer cholesterol: Picking sides. *Traffic* **19**, 750-760, doi:10.1111/tra.12586 (2018).
- 72 Gu, R. X., Baoukina, S. & Tieleman, D. P. Cholesterol Flip-Flop in Heterogeneous Membranes. *J Chem Theory Comput* **15**, 2064-2070, doi:10.1021/acs.jctc.8b00933 (2019).
- 73 Ramstedt, B. & Slotte, J. P. Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1945-1956, doi:10.1016/j.bbamem.2006.05.020 (2006).
- 74 Mondal, M., Mesmin, B., Mukherjee, S. & Maxfield, F. R. Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells. *Mol Biol Cell* **20**, 581-588, doi:10.1091/mbc.E08-07-0785 (2009).
- 75 Giang, H. & Schick, M. How cholesterol could be drawn to the cytoplasmic leaf of the plasma membrane by phosphatidylethanolamine. *Biophys J* **107**, 2337-2344, doi:10.1016/j.bpj.2014.10.012 (2014).
- 76 Liu, S. L. *et al.* Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane cholesterol. *Nat Chem Biol* **13**, 268-274, doi:10.1038/nchembio.2268 (2017).
- 77 Courtney, K. C., Fung, K. Y., Maxfield, F. R., Fairn, G. D. & Zha, X. Comment on 'Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane cholesterol'. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.38493 (2018).
- 78 Lee, A. G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 62-87, doi:10.1016/j.bbamem.2004.05.012 (2004).
- 79 Huang, J. & Feigenson, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J* **76**, 2142-2157, doi:10.1016/S0006-3495(99)77369-8 (1999).
- 80 McConnell, H. M. & Radhakrishnan, A. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 159-173, doi:10.1016/s0005-2736(03)00015-4 (2003).
- 81 Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572, doi:10.1038/42408 (1997).
- 82 Sevcsik, E. & Schutz, G. J. With or without rafts? Alternative views on cell membranes. *Bioessays* **38**, 129-139, doi:10.1002/bies.201500150 (2016).
- 83 Jacobson, K., Liu, P. & Lagerholm, B. C. The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. *Cell* **177**, 806-819, doi:10.1016/j.cell.2019.04.018 (2019).
- 84 Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50, doi:10.1126/science.1174621 (2010).
- 85 Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. & Eggeling, C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 361-374, doi:10.1038/nrm.2017.16 (2017).
- 86 Lorent, J. H. *et al.* Structural determinants and functional consequences of protein affinity for membrane rafts. *Nat Commun* **8**, 1219, doi:10.1038/s41467-017-01328-3 (2017).
- 87 Egawa, J., Pearn, M. L., Lemkuil, B. P., Patel, P. M. & Head, B. P. Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J Physiol* **594**, 4565-4579, doi:10.1113/JP270590 (2016).
- 88 Pollet, H., Conrard, L., Cloos, A. S. & Tyteca, D. Plasma Membrane Lipid Domains as Platforms for Vesicle Biogenesis and Shedding? *Biomolecules* **8**, doi:10.3390/biom8030094 (2018).

- 89 Simons, K. & Ehehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* **110**, 597-603, doi:10.1172/JCI16390 (2002).
- 90 Zakany, F., Kovacs, T., Panyi, G. & Varga, Z. Direct and indirect cholesterol effects on membrane proteins with special focus on potassium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1865**, 158706, doi:10.1016/j.bbalip.2020.158706 (2020).
- 91 Levitan, I., Singh, D. K. & Rosenhouse-Dantsker, A. Cholesterol binding to ion channels. *Front Physiol* **5**, 65, doi:10.3389/fphys.2014.00065 (2014).
- 92 Baier, C. J., Fantini, J. & Barrantes, F. J. Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Sci Rep* **1**, 69, doi:10.1038/srep00069 (2011).
- 93 Hanson, M. A. *et al.* A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure* **16**, 897-905, doi:10.1016/j.str.2008.05.001 (2008).
- 94 Rosenhouse-Dantsker, A. Insights Into the Molecular Requirements for Cholesterol Binding to Ion Channels. *Curr Top Membr* **80**, 187-208, doi:10.1016/bs.ctm.2017.05.003 (2017).
- 95 Wheeler, S., Schmid, R. & Sillence, D. J. Lipid(-)Protein Interactions in Niemann(-)Pick Type C Disease: Insights from Molecular Modeling. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20030717 (2019).
- 96 Miller, C. M., Brown, A. C. & Mittal, J. Disorder in cholesterol-binding functionality of CRAC peptides: a molecular dynamics study. *J Phys Chem B* **118**, 13169-13174, doi:10.1021/jp5106423 (2014).
- 97 Balajthy, A., Hajdu, P., Panyi, G. & Varga, Z. Sterol Regulation of Voltage-Gated K(+) Channels. *Curr Top Membr* **80**, 255-292, doi:10.1016/bs.ctm.2017.05.006 (2017).
- 98 Barbera, N. & Levitan, I. Chiral Specificity of Cholesterol Orientation Within Cholesterol Binding Sites in Inwardly Rectifying K(+) Channels. *Adv Exp Med Biol* **1115**, 77-95, doi:10.1007/978-3-030-04278-3_4 (2019).
- 99 Rosenhouse-Dantsker, A., Noskov, S., Durdagi, S., Logothetis, D. E. & Levitan, I. Identification of novel cholesterol-binding regions in Kir2 channels. *J Biol Chem* **288**, 31154-31164, doi:10.1074/jbc.M113.496117 (2013).
- 100 Singh, A. K. *et al.* Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in cytosolic C tail of Slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca²⁺- and voltage-gated K⁺ (BK) channels. *J Biol Chem* **287**, 20509-20521, doi:10.1074/jbc.M112.356261 (2012).
- 101 Murrell-Lagnado, R. D. Regulation of P2X Purinergic Receptor Signaling by Cholesterol. *Curr Top Membr* **80**, 211-232, doi:10.1016/bs.ctm.2017.05.004 (2017).
- 102 Furst, O., Nichols, C. G., Lamoureux, G. & D'Avanzo, N. Identification of a cholesterol-binding pocket in inward rectifier K(+) (Kir) channels. *Biophys J* **107**, 2786-2796, doi:10.1016/j.bpj.2014.10.066 (2014).
- 103 Barbera, N., Ayee, M. A. A., Akpa, B. S. & Levitan, I. Molecular Dynamics Simulations of Kir2.2 Interactions with an Ensemble of Cholesterol Molecules. *Biophys J* **115**, 1264-1280, doi:10.1016/j.bpj.2018.07.041 (2018).
- 104 Bidet, M. *et al.* The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One* **6**, e23834, doi:10.1371/journal.pone.0023834 (2011).
- 105 Ipsen, J. H., Karlstrom, G., Mouritsen, O. G., Wennerstrom, H. & Zuckermann, M. J. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* **905**, 162-172, doi:10.1016/0005-2736(87)90020-4 (1987).
- 106 Leeb, F. & Maibaum, L. Spatially Resolving the Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophys J* **115**, 2179-2188, doi:10.1016/j.bpj.2018.10.024 (2018).
- 107 Xu, X. & London, E. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* **39**, 843-849, doi:10.1021/bi992543v (2000).
- 108 Owen, D. M., Williamson, D. J., Magenau, A. & Gaus, K. Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nat Commun* **3**, 1256, doi:10.1038/ncomms2273 (2012).

- 109 Ma, Y., Benda, A., Kwiatek, J., Owen, D. M. & Gaus, K. Time-Resolved Laurdan
Fluorescence Reveals Insights into Membrane Viscosity and Hydration Levels. *Biophys J* **115**,
1498-1508, doi:10.1016/j.bpj.2018.08.041 (2018).
- 110 Nezil, F. A. & Bloom, M. Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic
peptides upon bilayer thickness in model membranes. *Biophys J* **61**, 1176-1183,
doi:10.1016/S0006-3495(92)81926-4 (1992).
- 111 Mouritsen, O. G. & Bloom, M. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes.
Biophys J **46**, 141-153, doi:10.1016/S0006-3495(84)84007-2 (1984).
- 112 Brown, M. F. Soft Matter in Lipid-Protein Interactions. *Annu Rev Biophys* **46**, 379-410,
doi:10.1146/annurev-biophys-070816-033843 (2017).
- 113 Needham, D. & Nunn, R. S. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes
containing cholesterol. *Biophys J* **58**, 997-1009, doi:10.1016/S0006-3495(90)82444-9 (1990).
- 114 Pan, J., Mills, T. T., Tristram-Nagle, S. & Nagle, J. F. Cholesterol perturbs lipid bilayers
nonuniversally. *Phys Rev Lett* **100**, 198103, doi:10.1103/PhysRevLett.100.198103 (2008).
- 115 Cantor, R. S. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. *Biophys J* **76**,
2625-2639, doi:10.1016/S0006-3495(99)77415-1 (1999).
- 116 Chen, Z. & Rand, R. P. The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and
bending elasticity. *Biophys J* **73**, 267-276, doi:10.1016/S0006-3495(97)78067-6 (1997).
- 117 Krishna, A. & Sengupta, D. Interplay between Membrane Curvature and Cholesterol: Role of
Palmitoylated Caveolin-1. *Biophys J* **116**, 69-78, doi:10.1016/j.bpj.2018.11.3127 (2019).
- 118 Marsh, D. Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation
and conformation of proteins in membranes. *Biophys J* **93**, 3884-3899,
doi:10.1529/biophysj.107.107938 (2007).
- 119 O'Shea, P. Physical landscapes in biological membranes: physico-chemical terrains for spatio-
temporal control of biomolecular interactions and behaviour. *Philos Trans A Math Phys Eng
Sci* **363**, 575-588, doi:10.1098/rsta.2004.1509 (2005).
- 120 Wang, L. Measurements and implications of the membrane dipole potential. *Annu Rev
Biochem* **81**, 615-635, doi:10.1146/annurev-biochem-070110-123033 (2012).
- 121 Shen, H. *et al.* Effect of Cholesterol on Membrane Dipole Potential: Atomistic and Coarse-
Grained Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput* **14**, 3780-3795,
doi:10.1021/acs.jctc.8b00092 (2018).
- 122 Starke-Peterkovic, T. *et al.* Cholesterol effect on the dipole potential of lipid membranes.
Biophys J **90**, 4060-4070, doi:10.1529/biophysj.105.074666 (2006).
- 123 Barbera, N., Ayee, M. A. A., Akpa, B. S. & Levitan, I. Differential Effects of Sterols on Ion
Channels: Stereospecific Binding vs Stereospecific Response. *Curr Top Membr* **80**, 25-50,
doi:10.1016/bs.ctm.2017.06.001 (2017).
- 124 Rog, T. & Pasenkiewicz-Gierula, M. Effects of epicholesterol on the phosphatidylcholine
bilayer: a molecular simulation study. *Biophys J* **84**, 1818-1826, doi:10.1016/S0006-
3495(03)74989-3 (2003).
- 125 D'Avanzo, N., Hyrc, K., Enkvetchakul, D., Covey, D. F. & Nichols, C. G. Enantioselective
protein-sterol interactions mediate regulation of both prokaryotic and eukaryotic inward
rectifier K⁺ channels by cholesterol. *PLoS One* **6**, e19393, doi:10.1371/journal.pone.0019393
(2011).
- 126 Romanenko, V. G., Rothblat, G. H. & Levitan, I. Modulation of endothelial inward-rectifier
K⁺ current by optical isomers of cholesterol. *Biophys J* **83**, 3211-3222, doi:10.1016/S0006-
3495(02)75323-X (2002).
- 127 Picazo-Juarez, G. *et al.* Identification of a binding motif in the S5 helix that confers
cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *J Biol Chem* **286**, 24966-24976,
doi:10.1074/jbc.M111.237537 (2011).
- 128 Bukiya, A. N., Singh, A. K., Parrill, A. L. & Dopico, A. M. The steroid interaction site in
transmembrane domain 2 of the large conductance, voltage- and calcium-gated potassium
(BK) channel accessory beta1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20207-20212,
doi:10.1073/pnas.1112901108 (2011).

- 129 Sooksawate, T. & Simmonds, M. A. Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *Neuropharmacology* **40**, 178-184 (2001).
- 130 Addona, G. H., Sandermann, H., Jr., Kloczewiak, M. A. & Miller, K. W. Low chemical specificity of the nicotinic acetylcholine receptor sterol activation site. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 177-182, doi:10.1016/s0005-2736(02)00685-5 (2003).
- 131 Hamouda, A. K., Chiara, D. C., Sauls, D., Cohen, J. B. & Blanton, M. P. Cholesterol interacts with transmembrane alpha-helices M1, M3, and M4 of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: photolabeling studies using [3H]Azicholesterol. *Biochemistry* **45**, 976-986, doi:10.1021/bi051978h (2006).
- 132 Pasenkiewicz-Gierula, M., Rog, T., Kitamura, K. & Kusumi, A. Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study. *Biophys J* **78**, 1376-1389, doi:10.1016/S0006-3495(00)76691-4 (2000).
- 133 Cowgill, J. & Chanda, B. The contribution of voltage clamp fluorometry to the understanding of channel and transporter mechanisms. *J Gen Physiol* **151**, 1163-1172, doi:10.1085/jgp.201912372 (2019).
- 134 Elinder, F. & Liin, S. I. Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Front Physiol* **8**, 43, doi:10.3389/fphys.2017.00043 (2017).
- 135 Szilagyi, O., Boratko, A., Panyi, G. & Hajdu, P. The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse. *Pflugers Arch* **465**, 1341-1353, doi:10.1007/s00424-013-1256-6 (2013).
- 136 Perez-Verdaguer, M. *et al.* Caveolin interaction governs Kv1.3 lipid raft targeting. *Sci Rep* **6**, 22453, doi:10.1038/srep22453 (2016).
- 137 Sole, L. *et al.* KCNE4 suppresses Kv1.3 currents by modulating trafficking, surface expression and channel gating. *J Cell Sci* **122**, 3738-3748, doi:10.1242/jcs.056689 (2009).
- 138 Panyi, G. *et al.* Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1285-1290, doi:10.1073/pnas.0307421100 (2004).
- 139 Nicolaou, S. A. *et al.* Differential calcium signaling and Kv1.3 trafficking to the immunological synapse in systemic lupus erythematosus. *Cell Calcium* **47**, 19-28, doi:10.1016/j.ceca.2009.11.001 (2010).
- 140 O'Connell, K. M., Loftus, R. & Tamkun, M. M. Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12351-12356, doi:10.1073/pnas.1003028107 (2010).
- 141 Jimenez-Garduno, A. M. *et al.* KV10.1 K(+) channel plasma membrane discrete domain partitioning and its functional correlation in neurons. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 921-931, doi:10.1016/j.bbamem.2013.11.007 (2014).
- 142 Martens, J. R. *et al.* Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J Biol Chem* **275**, 7443-7446, doi:10.1074/jbc.275.11.7443 (2000).
- 143 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 Kv1.5 to caveolae. *J Biol Chem* **276**, 8409-8414, doi:10.1074/jbc.M009948200 (2001).
- 144 Hajdu, P., Varga, Z., Pieri, C., Panyi, G. & Gaspar, R., Jr. Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflugers Arch* **445**, 674-682, doi:10.1007/s00424-002-0974-y (2003).
- 145 Delgado-Ramirez, M., Sanchez-Armass, S., Meza, U. & Rodriguez-Menchaca, A. A. Regulation of Kv7.2/Kv7.3 channels by cholesterol: Relevance of an optimum plasma membrane cholesterol content. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1860**, 1242-1251, doi:10.1016/j.bbamem.2018.02.016 (2018).
- 146 Balajthy, A. *et al.* 7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Pflugers Arch* **468**, 1403-1418, doi:10.1007/s00424-016-1851-4 (2016).
- 147 Decoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S. & Cahalan, M. D. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* **307**, 465-468 (1984).

- 148 Feske, S., Wulff, H. & Skolnik, E. Y. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **33**, 291-353, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112212 (2015).
- 149 Wulff, H., Knaus, H. G., Pennington, M. & Chandy, K. G. K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol.* **173**, 776-786 (2004).
- 150 Wulff, H. *et al.* The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J.Clin.Invest* **111**, 1703-1713 (2003).
- 151 Beeton, C. *et al.* Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 17414-17419 (2006).
- 152 Maezawa, I. *et al.* Kv1.3 inhibition as a potential microglia-targeted therapy for Alzheimer's disease: preclinical proof of concept. *Brain* **141**, 596-612, doi:10.1093/brain/awx346 (2018).
- 153 Szabo, I. *et al.* Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14861-14866, doi:10.1073/pnas.0804236105 (2008).
- 154 Kundu-Raychaudhuri, S., Chen, Y. J., Wulff, H. & Raychaudhuri, S. P. Kv1.3 in psoriatic disease: PAP-1, a small molecule inhibitor of Kv1.3 is effective in the SCID mouse psoriasis--xenograft model. *J Autoimmun* **55**, 63-72, doi:10.1016/j.jaut.2014.07.003 (2014).
- 155 Koch Hansen, L. *et al.* Expression of T-cell KV1.3 potassium channel correlates with pro-inflammatory cytokines and disease activity in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* **8**, 1378-1391, doi:10.1016/j.crohns.2014.04.003 (2014).
- 156 Koshy, S. *et al.* Blocking KV1.3 channels inhibits Th2 lymphocyte function and treats a rat model of asthma. *J Biol Chem* **289**, 12623-12632, doi:10.1074/jbc.M113.517037 (2014).
- 157 Xu, J. *et al.* The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3112-3117, doi:10.1073/pnas.0308450100 (2004).
- 158 Rangaraju, S., Gearing, M., Jin, L. W. & Levey, A. Potassium channel Kv1.3 is highly expressed by microglia in human Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **44**, 797-808, doi:10.3233/JAD-141704 (2015).
- 159 Azam, P., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Griffey, S. & Wulff, H. Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. *J.Invest Dermatol.* **127**, 1419-1429 (2007).
- 160 Tanner, M. R. *et al.* Prolonged immunomodulation in inflammatory arthritis using the selective Kv1.3 channel blocker HsTX1[R14A] and its PEGylated analog. *Clin Immunol* **180**, 45-57, doi:10.1016/j.clim.2017.03.014 (2017).
- 161 Li, Z. *et al.* Selective inhibition of CCR7(-) effector memory T cell activation by a novel peptide targeting Kv1.3 channel in a rat experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Biol Chem* **287**, 29479-29494, doi:10.1074/jbc.M112.379594 (2012).
- 162 Cazares-Ordóñez, V. & Pardo, L. A. Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. *Biochem Cell Biol* **95**, 531-536, doi:10.1139/bcb-2017-0062 (2017).
- 163 Ferreira, N. R., Mitkovski, M., Stuhmer, W., Pardo, L. A. & Del Bel, E. A. Ether-a-go-go 1 (Eag1) potassium channel expression in dopaminergic neurons of basal ganglia is modulated by 6-hydroxydopamine lesion. *Neurotoxicity research* **21**, 317-333, doi:10.1007/s12640-011-9286-3 (2012).
- 164 Ufartes, R. *et al.* Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice. *Hum Mol Genet* **22**, 2247-2262, doi:10.1093/hmg/ddt076 (2013).
- 165 Simons, C. *et al.* Mutations in the voltage-gated potassium channel gene KCNH1 cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nat Genet* **47**, 73-77, doi:10.1038/ng.3153 (2015).
- 166 Kortum, F. *et al.* Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nat Genet* **47**, 661-667, doi:10.1038/ng.3282 (2015).
- 167 Pardo, L. A. *et al.* Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J* **18**, 5540-5547, doi:10.1093/emboj/18.20.5540 (1999).
- 168 Hemmerlein, B. *et al.* Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* **5**, 41, doi:10.1186/1476-4598-5-41 (2006).
- 169 Ouadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A. & Pardo, L. A. Kv10.1 K(+) channel: from physiology to cancer. *Pflugers Arch* **468**, 751-762, doi:10.1007/s00424-015-1784-3 (2016).

- 170 Gomez-Varela, D. *et al.* Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer research* **67**, 7343-7349, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0107 (2007).
- 171 Moreels, L. *et al.* APETx4, a Novel Sea Anemone Toxin and a Modulator of the Cancer-Relevant Potassium Channel KV10.1. *Mar Drugs* **15**, doi:10.3390/md15090287 (2017).
- 172 Boldrini-Franca, J. *et al.* Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. *Sci Rep* **10**, 4476, doi:10.1038/s41598-020-61258-x (2020).
- 173 Na, W. *et al.* Procyanidin B1, a novel and specific inhibitor of Kv10.1 channel, suppresses the evolution of hepatoma. *Biochem Pharmacol* **178**, 114089, doi:10.1016/j.bcp.2020.114089 (2020).
- 174 Hegle, A. P., Marble, D. D. & Wilson, G. F. A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-a-go-go K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2886-2891, doi:10.1073/pnas.0505909103 (2006).
- 175 Downie, B. R. *et al.* Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *J Biol Chem* **283**, 36234-36240, doi:10.1074/jbc.M801830200 (2008).
- 176 Chen, Y. *et al.* Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane. *PLoS One* **6**, e19257, doi:10.1371/journal.pone.0019257 (2011).
- 177 Irons, M., Elias, E. R., Salen, G., Tint, G. S. & Batta, A. K. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet* **341**, 1414, doi:10.1016/0140-6736(93)90983-n (1993).
- 178 Fernandez, C., Martin, M., Gomez-Coronado, D. & Lasuncion, M. A. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res* **46**, 920-929, doi:10.1194/jlr.M400407-JLR200 (2005).
- 179 Moog, C., Luu, B., Altmeyer, A. & Bischoff, P. Studies on the immunosuppressive properties of 7,25 dihydroxycholesterol--II. Effects on early steps of T-cell activation. *Int J Immunopharmacol* **11**, 559-565, doi:10.1016/0192-0561(89)90186-0 (1989).
- 180 Xu, L., Sheflin, L. G., Porter, N. A. & Fliesler, S. J. 7-Dehydrocholesterol-derived oxysterols and retinal degeneration in a rat model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 877-883, doi:10.1016/j.bbalip.2012.03.001 (2012).
- 181 Yamauchi, Y. & Rogers, M. A. Sterol Metabolism and Transport in Atherosclerosis and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 509, doi:10.3389/fendo.2018.00509 (2018).
- 182 Chang, T. Y., Yamauchi, Y., Hasan, M. T. & Chang, C. Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease. *J Lipid Res* **58**, 2239-2254, doi:10.1194/jlr.R075630 (2017).
- 183 Escriba, P. V. *et al.* Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res* **59**, 38-53, doi:10.1016/j.plipres.2015.04.003 (2015).
- 184 Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39, doi:10.1038/35036052 (2000).
- 185 Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M. E. & Yellen, G. Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* **19**, 175-184 (1997).
- 186 Panyi, G. & Deutsch, C. Probing the cavity of the slow inactivated conformation of shaker potassium channels. *J Gen Physiol* **129**, 403-418, doi:10.1085/jgp.200709758 (2007).
- 187 Holmgren, M., Shin, K. S. & Yellen, G. The activation gate of a voltage-gated K⁺ channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge. *Neuron* **21**, 617-621 (1998).
- 188 Holmgren, M., Jurman, M. E. & Yellen, G. N-type inactivation and the S4-S5 region of the Shaker K⁺ channel. *J Gen Physiol* **108**, 195-206 (1996).
- 189 Ding, S. & Horn, R. Tail end of the s6 segment: role in permeation in shaker potassium channels. *J Gen Physiol* **120**, 87-97 (2002).
- 190 Somodi, S. *et al.* Analysis of the K⁺ current in human CD4⁺ T lymphocytes in hypercholesterolemic state. *Cell Immunol* **281**, 20-26, doi:10.1016/j.cellimm.2013.01.004 (2013).
- 191 Singh, P., Paila, Y. D. & Chattopadhyay, A. Differential effects of cholesterol and 7-dehydrocholesterol on the ligand binding activity of the hippocampal serotonin(1A) receptor:

- implications in SLOS. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 495-499, doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.135 (2007).
- 192 Kovacs, T., Batta, G., Zakany, F., Szollosi, J. & Nagy, P. The dipole potential correlates with lipid raft markers in the plasma membrane of living cells. *J Lipid Res* **58**, 1681-1691, doi:10.1194/jlr.M077339 (2017).
- 193 Alvarez, O., Gonzalez, C. & Latorre, R. Counting channels: a tutorial guide on ion channel fluctuation analysis. *Advances in physiology education* **26**, 327-341, doi:10.1152/advan.00006.2002 (2002).
- 194 Bannister, J. P., Chanda, B., Bezanilla, F. & Papazian, D. M. Optical detection of rate-determining ion-modulated conformational changes of the ether-a-go-go K⁺ channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18718-18723, doi:10.1073/pnas.0505766102 (2005).
- 195 Terlau, H. *et al.* Extracellular Mg²⁺ regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflugers Arch* **432**, 301-312 (1996).
- 196 Terlau, H., Heinemann, S. H., Stuhmer, W., Pongs, O. & Ludwig, J. Amino terminal-dependent gating of the potassium channel rat eag is compensated by a mutation in the S4 segment. *J Physiol* **502 (Pt 3)**, 537-543, doi:10.1111/j.1469-7793.1997.537bj.x (1997).
- 197 Bock, J., Szabo, I., Gamper, N., Adams, C. & Gulbins, E. Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms. *Biochemical and biophysical research communications* **305**, 890-897 (2003).
- 198 Nicolaou, S. A. *et al.* Localization of Kv1.3 channels in the immunological synapse modulates the calcium response to antigen stimulation in T lymphocytes. *J Immunol* **183**, 6296-6302, doi:10.4049/jimmunol.0900613 (2009).
- 199 Izsepi, E. *et al.* Membrane microdomain organization, calcium signal, and NFAT activation as an important axis in polarized Th cell function. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **83**, 185-196, doi:10.1002/cyto.a.22234 (2013).
- 200 Klemic, K. G., Kirsch, G. E. & Jones, S. W. U-type inactivation of Kv3.1 and Shaker potassium channels. *Biophys J* **81**, 814-826, doi:10.1016/S0006-3495(01)75743-8 (2001).
- 201 Claydon, T. W., Kehl, S. J. & Fedida, D. Closed-state inactivation induced in K(V)1 channels by extracellular acidification. *Channels (Austin)* **2**, 139-142 (2008).
- 202 Claydon, T. W. *et al.* A direct demonstration of closed-state inactivation of K⁺ channels at low pH. *J Gen Physiol* **129**, 437-455, doi:10.1085/jgp.200709774 (2007).
- 203 Jamieson, Q. & Jones, S. W. Shaker IR T449 mutants separate C- from U-type inactivation. *J Membr Biol* **247**, 319-330, doi:10.1007/s00232-014-9634-3 (2014).
- 204 Kasimova, M. A., Tarek, M., Shaytan, A. K., Shaitan, K. V. & Delemotte, L. Voltage-gated ion channel modulation by lipids: insights from molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1322-1331, doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.024 (2014).
- 205 Chang, H. M., Reitstetter, R., Mason, R. P. & Gruener, R. Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J Membr Biol* **143**, 51-63, doi:10.1007/bf00232523 (1995).
- 206 Patel, A. J., Lazdunski, M. & Honore, E. Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Current opinion in cell biology* **13**, 422-428 (2001).
- 207 Clausen, M. V., Jarerattanachat, V., Carpenter, E. P., Sansom, M. S. P. & Tucker, S. J. Asymmetric mechanosensitivity in a eukaryotic ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E8343-E8351, doi:10.1073/pnas.1708990114 (2017).
- 208 Loukin, S., Zhou, X., Su, Z., Saimi, Y. & Kung, C. Wild-type and brachyolmia-causing mutant TRPV4 channels respond directly to stretch force. *J Biol Chem* **285**, 27176-27181, doi:10.1074/jbc.M110.143370 (2010).
- 209 Anishkin, A., Loukin, S. H., Teng, J. & Kung, C. Feeling the hidden mechanical forces in lipid bilayer is an original sense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7898-7905, doi:10.1073/pnas.1313364111 (2014).
- 210 Bukiya, A. N., Belani, J. D., Rychnovsky, S. & Dopico, A. M. Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions. *J Gen Physiol* **137**, 93-110, doi:10.1085/jgp.201010519 (2011).

- 211 Toselli, M., Biella, G., Taglietti, V., Cazzaniga, E. & Parenti, M. Caveolin-1 expression and membrane cholesterol content modulate N-type calcium channel activity in NG108-15 cells. *Biophys J* **89**, 2443-2457, doi:10.1529/biophysj.105.065623 (2005).
- 212 Romanenko, V. G. *et al.* Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophys J* **87**, 3850-3861, doi:10.1529/biophysj.104.043273 (2004).
- 213 Schmidt, D. & MacKinnon, R. Voltage-dependent K⁺ channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19276-19281, doi:10.1073/pnas.0810187105 (2008).
- 214 Latorre, R. & Miller, C. Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol* **71**, 11-30 (1983).
- 215 Dani, J. A. Ion-channel entrances influence permeation. Net charge, size, shape, and binding considerations. *Biophys J* **49**, 607-618, doi:10.1016/S0006-3495(86)83688-8 (1986).
- 216 Naranjo, D., Moldenhauer, H., Pincuntureo, M. & Diaz-Franulic, I. Pore size matters for potassium channel conductance. *J Gen Physiol* **148**, 277-291, doi:10.1085/jgp.201611625 (2016).
- 217 Keller, R. K., Arnold, T. P. & Fliesler, S. J. Formation of 7-dehydrocholesterol-containing membrane rafts in vitro and in vivo, with relevance to the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* **45**, 347-355, doi:10.1194/jlr.M300232-JLR200 (2004).
- 218 Shrivastava, S., Paila, Y. D., Dutta, A. & Chattopadhyay, A. Differential effects of cholesterol and its immediate biosynthetic precursors on membrane organization. *Biochemistry* **47**, 5668-5677, doi:10.1021/bi8001677 (2008).
- 219 Chen, C. & Tripp, C. P. A comparison of the behavior of cholesterol, 7-dehydrocholesterol and ergosterol in phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1673-1681, doi:10.1016/j.bbame.2012.03.009 (2012).
- 220 Liu, Y., Chipot, C., Shao, X. & Cai, W. The effects of 7-dehydrocholesterol on the structural properties of membranes. *Phys Biol* **8**, 056005, doi:10.1088/1478-3975/8/5/056005 (2011).
- 221 Samuli Ollila, O. H., Rog, T., Karttunen, M. & Vattulainen, I. Role of sterol type on lateral pressure profiles of lipid membranes affecting membrane protein functionality: Comparison between cholesterol, desmosterol, 7-dehydrocholesterol and ketosterol. *J Struct Biol* **159**, 311-323, doi:10.1016/j.jsb.2007.01.012 (2007).
- 222 Chattopadhyay, A. *et al.* Differential effects of cholesterol and 7-dehydrocholesterol on ligand binding of solubilized hippocampal serotonin1A receptors: implications in SLOS. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 800-805, doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.040 (2007).
- 223 Beby-Defaux, A. *et al.* Fatal adenovirus type 7b infection in a child with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Virol* **65**, 66-69 (2001).
- 224 Babovic-Vuksanovic, D., Jacobson, R. M., Lindor, N. M. & Weiler, C. R. Selective antibody immune deficiency in a patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Inherit Metab Dis* **28**, 181-186, doi:10.1007/s10545-005-5515-3 (2005).
- 225 Ren, G. *et al.* Alterations in membrane caveolae and BKCa channel activity in skin fibroblasts in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab* **104**, 346-355, doi:10.1016/j.ymgme.2011.04.019 (2011).
- 226 Badana, A. *et al.* Lipid Raft Integrity Is Required for Survival of Triple Negative Breast Cancer Cells. *J Breast Cancer* **19**, 372-384, doi:10.4048/jbc.2016.19.4.372 (2016).
- 227 Li, Y. C., Park, M. J., Ye, S. K., Kim, C. W. & Kim, Y. N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* **168**, 1107-1118; quiz 1404-1105, doi:10.2353/ajpath.2006.050959 (2006).
- 228 Kohl, T., Lorinczi, E., Pardo, L. A. & Stuhmer, W. Rapid internalization of the oncogenic K⁺ channel K(V)10.1. *PLoS One* **6**, e26329, doi:10.1371/journal.pone.0026329 (2011).
- 229 Laitko, U., Juranka, P. F. & Morris, C. E. Membrane stretch slows the concerted step prior to opening in a Kv channel. *J Gen Physiol* **127**, 687-701, doi:10.1085/jgp.200509394 (2006).
- 230 Bähring, R. & Covarrubias, M. Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *J Physiol* **589**, 461-479, doi:10.1113/jphysiol.2010.191965 (2011).
- 231 Bähring, R., Barghaan, J., Westermeyer, R. & Wollberg, J. Voltage sensor inactivation in potassium channels. *Frontiers in pharmacology* **3**, 100, doi:10.3389/fphar.2012.00100 (2012).

- 232 Kuo, C. C. & Bean, B. P. Na⁺ channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron* **12**, 819-829 (1994).
- 233 Armstrong, C. M. Na channel inactivation from open and closed states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17991-17996, doi:10.1073/pnas.0607603103 (2006).
- 234 Horn, R., Ding, S. & Gruber, H. J. Immobilizing the moving parts of voltage-gated ion channels. *J Gen Physiol* **116**, 461-476 (2000).
- 235 Shin, K. S., Maertens, C., Proenza, C., Rothberg, B. S. & Yellen, G. Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage. *Neuron* **41**, 737-744, doi:10.1016/s0896-6273(04)00083-2 (2004).
- 236 Bähring, R., Boland, L. M., Varghese, A., Gebauer, M. & Pongs, O. Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *J Physiol* **535**, 65-81 (2001).
- 237 Fineberg, J. D., Szanto, T. G., Panyi, G. & Covarrubias, M. Closed-state inactivation involving an internal gate in Kv4.1 channels modulates pore blockade by intracellular quaternary ammonium ions. *Sci Rep* **6**, 31131, doi:10.1038/srep31131 (2016).
- 238 Perry, M. D. *et al.* Getting to the heart of hERG K(+) channel gating. *J Physiol* **593**, 2575-2585, doi:10.1113/JP270095 (2015).
- 239 Perry, M. D., Wong, S., Ng, C. A. & Vandenberg, J. I. Hydrophobic interactions between the voltage sensor and pore mediate inactivation in Kv11.1 channels. *J Gen Physiol* **142**, 275-288, doi:10.1085/jgp.201310975 (2013).
- 240 Klemic, K. G., Shieh, C. C., Kirsch, G. E. & Jones, S. W. Inactivation of Kv2.1 potassium channels. *Biophys J* **74**, 1779-1789, doi:10.1016/S0006-3495(98)77888-9 (1998).
- 241 Jerng, H. H. & Covarrubias, M. K⁺ channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys J* **72**, 163-174, doi:10.1016/S0006-3495(97)78655-7 (1997).
- 242 Kurata, H. T., Doerksen, K. W., Eldstrom, J. R., Rezazadeh, S. & Fedida, D. Separation of P/C- and U-type inactivation pathways in Kv1.5 potassium channels. *J Physiol* **568**, 31-46, doi:10.1113/jphysiol.2005.087148 (2005).
- 243 Vandenberg, J. I. *et al.* hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev* **92**, 1393-1478, doi:10.1152/physrev.00036.2011 (2012).
- 244 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 (1998).
- 245 Ayer, R. K., Jr. & Sigworth, F. J. Enhanced closed-state inactivation in a mutant Shaker K⁺ channel. *J Membr Biol* **157**, 215-230 (1997).
- 246 Soler-Llavina, G. J., Holmgren, M. & Swartz, K. J. Defining the conductance of the closed state in a voltage-gated K⁺ channel. *Neuron* **38**, 61-67, doi:10.1016/s0896-6273(03)00157-0 (2003).
- 247 Gibor, G., Yakubovich, D., Peretz, A. & Attali, B. External barium affects the gating of KCNQ1 potassium channels and produces a pore block via two discrete sites. *J Gen Physiol* **124**, 83-102, doi:10.1085/jgp.200409068 (2004).
- 248 Harris, R. E., Larsson, H. P. & Isacoff, E. Y. A permanent ion binding site located between two gates of the Shaker K⁺ channel. *Biophys J* **74**, 1808-1820, doi:10.1016/s0006-3495(98)77891-9 (1998).
- 249 Abbruzzese, J., Sachse, F. B., Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M. C. Modification of hERG1 channel gating by Cd²⁺. *J Gen Physiol* **136**, 203-224, doi:10.1085/jgp.201010450 (2010).
- 250 Tu, Y. C., Yang, Y. C. & Kuo, C. C. Modulation of NMDA channel gating by Ca(2+) and Cd(2+) binding to the external pore mouth. *Sci Rep* **6**, 37029, doi:10.1038/srep37029 (2016).

9. Tárgyszavak

Tárgyszavak:

Sejtmembrán
koleszterin
feszültségkapuzott káliumcsatornák
Shaker csatorna
aktivációs kapu
C-típusú inaktiváció
inaktivációból történő visszatérés
patch-clamp
kételektródás voltage-clamp fluorimetra
konfokális mikroszkópia

Keywords

Cell membrane
cholesterol
voltage-gated potassium channels
Shaker ionchannel
activation gate
C-type inactivation
recovery from inactivation
patch-clamp
two-electrode voltage-clamp fluorometry
confocal microscopy

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Panyi Györgynek, hogy témavezetőként, és az Intézet jelenlegi vezetőjeként gyakorlati és elméleti tanácsaival tudományos diákkörös munkám kezdete óta folyamatosan támogatta és segítette fejlődésemet, előrehaladásomat, valamint doktori értekezésem elkészítését.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet korábbi vezetőjének, Prof. Dr. Szöllösi Jánosnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy elkezdhessek az Intézetben dolgozni és biztosította számomra a folyamatos magas színvonalú munka és szakmai fejlődés lehetőségét.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Mátyus Lászlónak, az Általános Orvostudományi Kar dékjának, az OTDK Orvos-és Egészségtudományi Szekció Szakmai Bizottságának elnökének, Intézetünk tanszékvezető professzorának, hogy biztosította számomra a folyamatos magas színvonalú munka és szakmai fejlődés lehetőségét a tudományos diákköri munkám során.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Varga Zoltánnak, aki munkacsoportvezetőként, közvetlen főnökömként folyamatosan támogatta és segítette fejlődésemet, előrehaladásomat, a kísérletek gyakorlati kivitelezését, valamint a tudományos közleményeim megszületését.

Köszönet illeti Nagy Cecília és Bagosi Adrienn asszisztens kollégáimat, valamint kollaborációs partnereimet, Prof. Dr. Nagy Pétert, Prof. Dr. Carol J. Deutsch-ot, Prof. Dr. Sente Lajost, Dr. Szántó G. Tibort, Dr. Papp Pált, Dr. Papp Ferencet, Dr. Kovács Tamást, Dr. Péter Máriát a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségükért, tanácsaikért, baráti támogatásukért. Továbbá köszönetet szeretnék mondani Munkacsoportunk és Intézetünk összes kollégájának a munkám során nyújtott támogatásukért.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Családomnak, Édesanyámnak, Édesapámnak, Nővéremnek és életem legfontosabb „kollaborációs társának”, Férjemnek, Dr. Kovács Tamásnak azt a mérhetetlen szeretetet, támogatást és türelmet, amelyet a munkám során kaptam és amely nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

A disszertáció elkészítéséhez szükséges kísérletek elvégzését az alábbi pályázatokból nyert források támogatták: EFOP-3.6.2-16-2017-00006, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, OTKA K119417, ÚNKP-18-3-IV-DE-54, ÚNKP-19-3-III-DE-92, NTP-NFTÖ-20-B-0115, KTIA_NAP_13-2-2015-0009, KTIA_NAP_13-2-2017-0013, OTKA K132906.

11. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/153/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Zákány Florina
Neptun kód: E1X0PA
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10045513

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szántó, G. T.*, Zákány, F.*, Papp, F., Varga, Z., Deutsch, C., Panyi, G.: The activation gate controls steady-state inactivation and recovery from inactivation in Shaker.
J. Gen. Physiol. 152 (8), 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.202012591>
* These authors contributed equally to this work.
IF: 4.258 (2018)
2. Zákány, F., Pap, P., Papp, F., Kovács, T., Nagy, P., Péter, M., Szente, L., Panyi, G., Varga, Z.:
Determining the target of membrane sterols on voltage-gated potassium channels.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1864 (3), 312-325, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.12.006>
IF: 4.402 (2018)





További közlemények

3. Zákány, F., Kovács, T., Panyi, G., Varga, Z.: Direct and indirect cholesterol effects on membrane proteins with special focus on potassium channels.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1865 (8), 1-27, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158706>
IF: 4.402 (2018)
4. Kovács, T., Batta, G., Zákány, F., Szöllősi, J., Nagy, P.: The dipole potential correlates with lipid raft markers in the plasma membrane of living cells.
J. Lipid Res. 58 (8), 1681-1691, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M077339>
IF: 4.505
5. Kovács, T., Batta, G., Hajdu, T., Nagyné Szabó, Á. T., Váradi, T., Zákány, F., Csomós, I., Szöllősi, J., Nagy, P.: The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency.
Sci. Rep. 6, 35850, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35850>
IF: 4.259

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,826

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,66

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

Debrecen, 2020.05.28.

