

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

K⁺ csatornák vizsgálata natív és heterológ expressziós rendszerekben



Hajdú Péter Béla

Témavezetők: Dr. Gáspár Rezső

Dr. Panyi György

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS – ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET**

Debrecen, 2002

I. BEVEZETÉS.....	3
I.1 CÉLKITŰZÉSEK.....	4
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
II.1 A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ ÉS AZ IONCSATORNÁK SZEREPE.....	5
II.2 A Kv1.3 TÍPUSÚ CSATORNA	6
II.3 AZ IONCSATORNA ÉS LIPIDKÖRNYEZETE	8
II.4 A KÉTPÓRUSÚ K ⁺ CSATORNÁK.....	9
II.5 A CSATORNA-GÁTLÓSZEREK OSZTÁLYOZÁSA	11
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	14
III.1 SEJTEK	14
III.2 MOLEKULÁRIS BIOLÓGIA	14
III.3 KOLESZTERIN KIVONÁS ÉS BEVITEL	15
III.4 ELEKTROFIZIOLÓGIA.....	15
III.5 FLUORESZENCIA POLARIZÁCIÓS ANIZOTRÓPIA MÉRÉSEK	17
III.6 OLDATOK.....	17
III.7 AZ ADATOK KIÉRTÉKELÉSE.....	19
III.8 ANYAGOK.....	19
III.9 SKORPIÓ TOXINOK	20
IV. EREDMÉNYEK	21
IV.1 A KOLESZTERIN HATÁSA A Kv1.3 CSATORNÁK INAKTIVÁCIÓS ÉS AKTIVÁCIÓS KAPUZÁSÁRA	21
IV.1.1 A koleszterin hatása a membránfluiditásra	21
IV.1.2 A koleszterin módosítja a Kv1.3 csatorna inaktivációs kinetikáját	22
IV.1.3 A koleszterinszint emelés lassítja a Kv1.3 aktivációja.....	24
IV.1.4 Az aktiváció és inaktiváció egyensúlyi paraméterei	28
IV.2 A PI1 TOXIN HATÁSA A Kv1.3 CSATORNÁK ÁRAMÁRA	30
IV.3 GÁTLÓSZER ÉS MUTAGENEZIS INDUKÁLT SZELEKTIVITÁSVÁLTOZÁS A cTBAK K ⁺ CSATORNÁBAN.....	33
IV.3.1 A D-norpropoxyphene és fluoxetine élettani hatása.....	33
IV.3.2 cTBAK-1 áram jellemzői <i>Xenopus laevis</i> oocitában.....	33
IV.3.3 NORP indukált szelektivitásváltozás.....	34
IV.3.4 A NORP hatása csökken az extracelluláris Na ⁺ hiányában.....	38
IV.3.5 A NORP a szelektivitási szűrővel lép kölcsönhatásba	39
IV.3.6 A Y105F mutáció módosítja a csatorna szelektivitását	42
V. MEGBESZÉLÉS.....	44
V.1 A KOLESZTERIN HATÁSA A Kv1.3 CSATORNÁK INAKTIVÁCIÓS ÉS AKTIVÁCIÓS KAPUZÁSÁRA	44
V.2 BEFOLYÁSOLJA-E A NEGYEDIK DISZULFID HÍD A PI1 TOXIN HATÉKONYSÁGÁT?	48
V.3 GÁTLÓSZER ÉS MUTAGENEZIS INDUKÁLT SZELEKTIVITÁSVÁLTOZÁS A cTBAK K ⁺ CSATORNÁBAN.....	50
VI. ÖSSZEFOGLALÁS.....	57
VII. SUMMARY	58

VIII.	IRODALOMJEGYZÉK	59
VIII.1	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	73
VIII.2	KÖNYVFEJEZETEK.....	73
VIII.3	EGYÉB KÖZLEMÉNYEK.....	73
VIII.4	MEGJELENT ABSZTRAKTOK, ELŐADÁSOK	74
IX.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76

I. BEVEZETÉS

A kálium (K^+) csatornák – bár szerkezetüket és működésüket tekintve nagyon eltérőek lehetnek - közös jellemzője, hogy megtalálhatók szinte minden élő sejtben (a legősibb csatornatípus), másrészt pedig mindannyian pórusképző, transzmembrán fehérjék (1; 2). Számos sejtszintű folyamatban játszanak meghatározó szerepet: a klasszikusnak tekinthető akciós potenciál és a nyugalmi membránpotenciál kialakításán túl, a sejtek térfogat-szabályozásának, proliferációjának, valamint a szervezet immunválaszának ma már bizonyítottan fontos szereplői (3; 4). A K^+ csatornák elkülönült vizsgálatát a különböző csatornafehérjéket kódoló DNS szakaszok klónozása, kromoszóma-lokalizációja, és a különböző expressziós rendszerekben történő kifejezése tette lehetővé, mely egyben hozzásegített a natív rendszerbeli élettani funkciójuk megértéséhez (5).

Az eddig klónozott K^+ csatornák aminosav szekvenciájának összevetéséből kitűnik, hogy e fehérje-szüpercsalád tagjai szinte kivétel nélkül rendelkeznek legalább egy, nagyon konzervatív szakasszal az ún. pórus régióval (P-régió), mely bizonyítottan szükséges a K^+ szelektivitás fenntartásához, az ionáramlást lehetővé tevő csatornapórus kibéleléséhez, valamint a csatorna gátlók szerek többségének a kötőhelye is ide lokalizálható. Ennek ellenére a csatornák funkciója nagyon eltérő lehet, melynek bizonyos struktúra-funkció momentumai még nem teljesen világosak.

Ph.D. munkám során mind szerkezetükben, mind élettani szerepükben különböző két K^+ csatornát vizsgáltam, az egyedüli közös bennük a fent említett pórus szekvencia. E két csatorna a feszültség kapuzott Kv1.3, és az újonnan felfedezett kétpórusú csatornák családjához tartozó egér cTBAK-1 (cardiac Two-pore Background K^+ channel) (6). Az előbbi az immunválasz kialakításában fontos szerepet játszó T limfociták domináns feszültség kapuzott csatornája, az utóbbi, mint az a nevében is belefoglaltatott, a szív

myocitáiban található, és feltételezhetően a sejtek ingerelhető állapotának a fenntartásában vesz részt.

I.1 Célkitűzések

Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A sejtmembrán összetétele, az egyes alkotóelemek aránya a különböző fiziológiás ill. patofiziológiás tényezők (pl. hiperkoleszterémia, vérkoleszterin) hatására megváltozik, mely maga után vonja a membrán fizikokémiai és strukturális módosulását. A membránban elhelyezkedő fehérjék normális működésének elengedhetetlen feltétele a membrán megfelelő fizikai és kémiai állapota. Ezért kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a Kv1.3 csatorna működését miképpen befolyásolja a lipid környezet módosulása, különös tekintettel a koleszterin tartalom megváltozására.
2. A *Pandinus imperator* venomjából izolált Pi1 toxin a többi frakciótól eltérően négy diszulfid híddal rendelkezik, eltérően a szokásos hat cisztein alkotta három kovalens hídtól. Ennek ismeretében azt kutattuk, hogy a feltételezhetően kompaktabb struktúra hogyan befolyásolja a toxin Kv1.3 csatornához történő kötődését.
3. Az általunk alkalmazott cTBAK csatorna gátlószerekről, a fluoxetine-ről (*FL*) és a D-norpropoxyphene-ről (*NORP*) vizsgálataink során kiderült, hogy teljesen eltérő a hatásmechanizmusuk. A *FL* klasszikus pórusblokkolónak bizonyult, míg a *NORP* megváltoztatta a csatorna szelektivitását. A csatornafehérje mutációjának segítségével kívántuk kideríteni, hogy a *NORP* annak mely régiójával lép kölcsönhatásba.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1 A limfocita aktiváció és az ioncsatornák szerepe

A specifikus antigén hatására *in vivo* kialakuló immunválasz feltétele a sejtek osztódását és differenciálódását magában foglaló limfocita aktiváció. Ennek kiinduló lépése a T-sejt receptor/CD3 (TCR/CD3) receptor komplex aktiválása, amelyet protein kinázok (PK) valamint a foszfatidil inozitol (IP_3) másodlagos hírvivő rendszer iniciálása követ (7). A folyamat eredményeképp az intracelluláris szabad Ca^{2+} szint megnövekszik, és a protein kináz C (PKC) aktiválódik (8). Az előbbi biokémiai folyamatok mellett számos fizikai tényező is szerepet játszik a plazmamembránon keresztül történő proliferatív jel a citoplazma és a gének irányába történő közvetítésében (9).

A limfocitákban eddig sokféle ioncsatornát (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) azonosítottak, de csak néhányat sikerült közülük megfelelően jellemezni, azok plazmamembránbeli koncentrációját és kromoszóma lokalizációját beleértve (10; 11). A humán T limfociták domináns ioncsatornája az *n*-típusú, depolarizációra aktiválódó K^+ csatorna, mely aminosav szekvencia homológia alapján a Kv1.3 kódot kapta (12-17). Az *n*-típusú csatornától eltérő kinetikai paraméterekkel és gyógyszer érzékenységgel rendelkező *n'* és *l*-típusú K^+ csatornák jelenlétét eddig csak egér eredetű limfocitákon írták le (16; 18; 19). Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák találhatók humán leukémiás T sejtekben és humán perifériás vérből preparált T sejtekben. A limfocita K^+ csatorna variabilitást molekuláris biológiai kutatási eredmények is alátámasztják.

Számos, egymástól független bizonyíték utal arra, hogy a K^+ csatornák szerepet játszanak a T sejt proliferációban:

- A nyugvó T sejtek membránjának K^+ konduktanciája megnő a mitogén indukált hiperpolarizációt követően. A feszültség vezérelt K^+ csatornák száma többszörösére emelkedhet a mitogén aktiváció során.
- A hagyományos K^+ csatorna gátlószerek, mint tetraetil-ammonium (TEA), charybdotoxin (ChTx), noxiustoxin (NxTx), margatoxin (MgTx)) gátolják mind a limfociták K^+ áramait, mind pedig a sejtek mitogén stimuláció eredményeként előálló proliferációját nem csak *in vitro*, hanem Koo és munkatársai friss eredményei alapján *in vivo* is (20-24).

Jelenleg még nem tisztázott, hogy a K^+ csatornák pontosan milyen mechanizmusokon keresztül hatnak a T sejt aktivációra. Mivel a limfociták membránpotenciálját elsősorban a K^+ diffúziós potenciál határozza meg, így valószínűleg a K^+ csatorna gátlószerek a membrán depolarizációja révén akadályozzák meg az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedését (20; 24; 25). Ez alapján valószínűsíthető, hogy a K^+ csatornák a nyugalmi membránpotenciált kellően negatív értéken tartva segítik elő a Ca^{2+} szignál kialakulását.

II.2 A Kv1.3 típusú csatorna

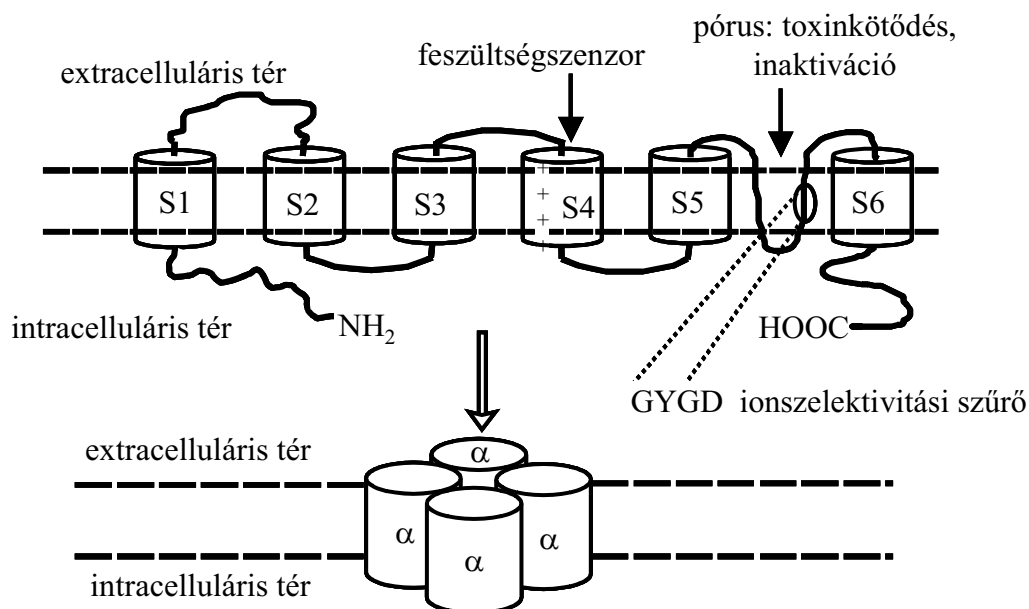
A Kv1.3 csatorna, mely felelős a limfociták *n*-típusú áramának kialakulásáért, a K^+ csatornák *Shaker* családjába tartozik (26). Az elmúlt évek során, a molekuláris biológiai módszerek segítségével sikerült nagy mennyiségű információt összegyűjteni az ioncsatornák működésének molekuláris mechanizmusáról. MacKinnon kísérleteiben rámutatott, hogy a *Shaker* csatornák négy azonos alegységből felépülő tetramer makromolekulák (27). Ezek az egyes alegységek hat, α -helikális transzmembrán szegmensből épülnek fel, melyeket az extra- és intracelluláris hurkok kapcsolnak össze. (lásd 1. ábra) Ezen szegmenseknek és hurkoknak jól meghatározott szerepük van a csatorna működésében (28).

A *Shaker* csatornák depolarizáció hatására gyorsan kinyitnak, majd egy nem vezető ún. inaktivált állapotba kerülnek. A csatornák aktiválódása során az S4 transzmembrán szegmens - az itt elhelyezkedő pozitív töltésű aminosavak miatt – az extracelluláris tér irányába mozdul, s ezáltal konformációváltozást hoz létre a csatornafehérjében (29). A Kv1.3 csatornák aktivációs küszöb feszültsége $-40 - -50$ mV körül van, s az egyensúlyi aktiváció feszültség függése a szigmoid futású Boltzmann-függvénnyel jellemezhető, amely $+20 - +30$ mV körül éri el csúcserőértékét, ekkor a csatornák nyitási valószínűsége megközelítőleg 1.

A *Shaker* csatornák inaktivációja az N-típusú és a C-típusú inaktiváció révén valósulhat meg. Az N-típusú mechanizmust a szakirodalomban az elfogadott „ball-and-chain” modell jellemzi (30; 31). Ezen modell szerint az intracelluláris (N-terminális) oldalon egy több pozitív töltést tartalmazó peptid szakasz („labda”) kapcsolódik minden csatornaalegységhez egy fehérje szálon („lánc”) keresztül, melyek az inaktiváció során bekötődnek a csatorna pórusába és azt eltömítik. A Kv1.3 csatornában hiányzik ez az inaktivációs egység, így inaktivációjáért kizárólag a C-típusú a felelős. A C-inaktiváció egy összetett, eddig nem tisztázott molekuláris folyamat eredménye, mely nagyon érzékeny a csatorna extracelluláris pórusát alkotó aminosavakra, valamint az extra- és intracelluláris ionösszetételre (32). A C-típusú inaktiváció kialakulására két elfogadott magyarázat is létezik:

- Az inaktiváció során a csatorna külső pórusának teljes beszűkülése megakadályozza az ionok áramlását (33; 34).
- A csatorna szelektivitási szűrőjének konformációs változása miatt az inaktivált csatornák nem permeábilisak K^+ -ra, viszont más ionokra (pl.: Na^+) ekkor válhatnak permeábilissá (35).

Mind a négy alegységben található, S5 és S6 -héliceket összekötő oligopeptid szakaszok együttesen alkotják a csatorna pórusát. Ebben a szakaszban található az a négy aminosavból álló szekvencia, amely feltételezhetően felelős a K^+ szelektivitásért. Továbbá a csatorna pórusát eltömítő gátlók is e régió aminosav oldalláncaival lépnek kölcsönhatásba.



1. ábra A Kv1.3 csatorna szerkezete és funkcionálisan fontos részei

II.3 Az ioncsatorna és lipidkörnyezete

A sejtek plazmamembránja egy foszfolipid kettős réteg, amelyben különféle receptorfehérjék, glikoproteinek, koleszterin, sphingolipid stb. található. 1970 óta tudjuk, hogy ez a lipid kettősréteg nem tekinthető merev rendszernek, hanem a benne lévő alkotórészek diffúzióra képesek, sőt akár egymással is kölcsönhatnak; ez a felismerés vezetett 1972-ben a Singer és Nicholson által felállított modellhez (36; 37). A sejt élete során a sejtmembrán összetétele különböző okok miatt (betegség, öregedés, étrendváltozás stb.) megváltozhat, ezáltal befolyásolja a membrán biofizikai sajátosságait (viszkozitás, görbület, feszülés stb.) és módosítja az integrális fehérjék funkcióját.

Koleszterin, amely az egyik meghatározó eleme az emlős sejtek membránjának, a membrán kettősréteg külső felében található, és elsősorban annak dinamikai paramétereit módosítja. *In vitro* kimutatták, hogy nem csak a sejtmembrán magas koleszterin szintje, hanem az élettani értéknél alacsonyabb koncentráció is gátolja a receptorfehérjék (nAChR, Na^+/K^+ -ATP-áz) megfelelő működését (38; 39). Számos tény támasztja alá, hogy a membrán koleszterintartalmának változtatása módosítja az ioncsatornák működését (40-43). Általánosan elmondható, hogy a koleszterin szint növelése csökkenti a csatornák aktivitását, míg kivonása stimulálja azokat. Jelenleg elfogadott elmélet szerint, a membrán megnövekedett viszkozitása egyrészt mechanikai, másrészt a lipid-fehérje kölcsönhatás által hat a csatornafehérje membránbeli mozgására. Ez utóbbi feltevést alátámasztják a *Shaker* csatornák S1-S3 transzmembrán szegmensében végzett triptofán/alanin pontmutációs kísérletek (44-46).

Ezenfelül Martens és munkatársai a közelmúltban kísérleteikkel igazolták, hogy bizonyos K^+ csatornák (Kv2.1 és Kv1.5) expressziós rendszertől függetlenül speciális mikrodoménekben, ún. raftokban (tutajokban) helyezkednek el, ellenben másokkal (pl. Kv4.2). A membrán koleszterintartalmának kivonása, mely a lipid raftrendszer szétesését segíti elő, a csatorna-klaszterek felbomlását jelentette, megváltoztatva a csatornák kapuzására jellemző egyensúlyi paramétereket (47; 48).

II.4 A kétpórusú K^+ csatornák

A K^+ csatornák egyre bővülő családját alkotják a két alegységből felépülő, alegységenként két pórus régiót (P1 és P2) tartalmazó, ún. 2-pórusú K^+ csatornák (2. ábra). Az egyes alegységek a membránt teljesen átívelő négy, α -helikális szegmensből (M1-M4) állnak, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnék össze. Az aminosav-szekvencia analízisek csupán 25-40% homológiát mutatnak a családon belüli egyes csatorna-osztályok

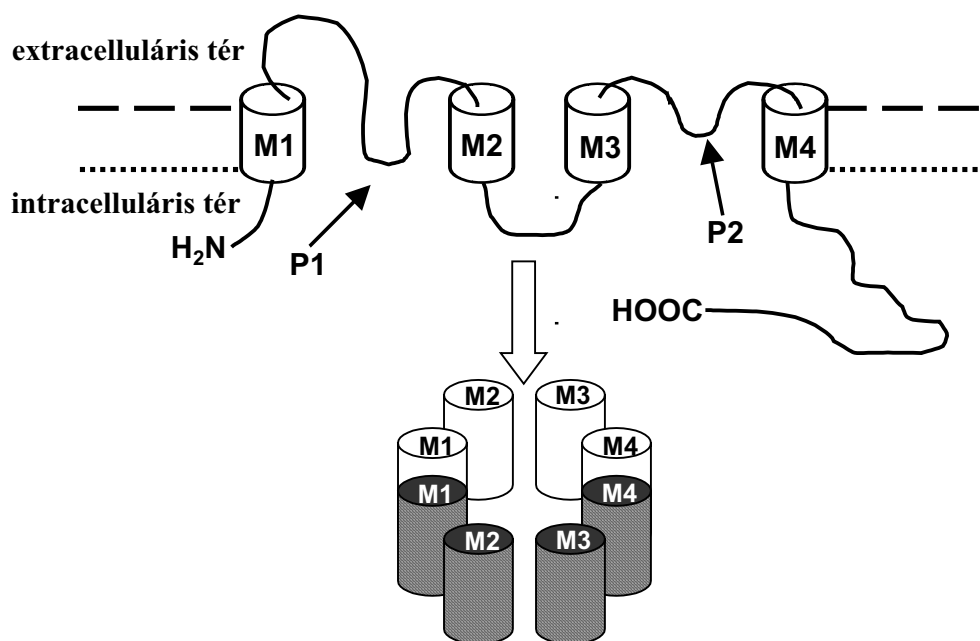
között, s a csatornák alapvető elektrofiziológiai sajátosságai nagy mértékben eltérhetnek egymástól.

A csatornák aktiválása teljesen különböző szignálok hatására jöhet létre (6; 49-58). Közös jellemzőjük, hogy intrinsic feszültség-kapuzással nem rendelkeznek, a hagyományos peptid (ChTx, MgTx stb.) és nem peptid jellegű (TEA, 4-AP) K^+ csatorna gátlószerekre kis mértékben vagy egyáltalán nem szenzitívek. Feltételezhető élettani szerepük a nyugalmi membránpotenciál kialakításában és fenntartásában van, ezek a csatornák tehetők felelőssé az ún. „szivárgási” áramért. A humán genom projektnek köszönhetően sikerült az első humán eredetű kétpórusú csatornát, a TWIK-1-et (**T**wo-pore **W**eak **I**nward **R**ectifier **K**⁺ channel) klónozni, majd expresszálni emlős sejtekben (52). Ezenfelül kimutatták a TWIK-1 esetében, hogy az M1 és P1 régió között található extracelluláris hurok ciszteinje (C69) felelős az alegységek homodimerizációjáért (59). Továbbá különböző csatornák alegységei (TASK-1 és TASK-5) *Xenopus* oocitákban expresszálódva funkcionális heterodimereket képeznek (60).

Az általunk vizsgált, egér myocytákból izolált cTBAK-1 (**C**ardiac **T**wo-pore **B**ackground **K**⁺ channel) K^+ csatorna az aminosav homológia (99%) és elektrofiziológiai tulajdonságok alapján az egér TASK-1 (**T**WIK **R**elated **A**cidic **S**ensitive **K**⁺ channel) csatornával azonos, és az ún. Goldman-Hodgkin-Katz- vagy open-rectifier, K^+ -szelektív csatornához tartoznak (61; 62). Mindkét csatorna rendkívül érzékeny az extracelluláris pH fiziológiás tartományon belül történő, relatíve kis változásaira, mely a szelektivitási szűrő közelében található hisztidinnek tulajdonítható (63). Másrészt, jelenleg az egyetlen ismert nagy affinitású és specifikus direkt gátlószere a TASK-1 csatornának a szervezet által termelt endocannabinoid típusú vegyület, az anandamid (64).

Az elmúlt években több tanulmány is beszámolt arról, hogy a TASK-1 csatorna a központi idegrendszer sejtjeiben expresszálódik, így feltehetőleg fontos szerepet játszik azok nyugalmi potenciáljának kialakításában, ezáltal befolyásolva elektromos aktivitásukat (49;

65-67). Továbbá arra is fény derült, hogy a klinikai gyakorlatban alkalmazott különböző altató és érzéstelenítő vegyületek (éter, halotán, kloroform) gátló vagy éppen ellenkezőleg, serkentő módon hatnak a TASK-1 csatorna működésére; mely azt igazolhatja, hogy valószínűleg ezen ioncsatornán keresztül történik meg az idegrendszer „átmeneti blokkolása” az anasztézia során (53; 68-70).



2. ábra A kétpórusú csatornák feltételezett szerkezete

II.5 A csatorna-gátlók szerek osztályozása

A csatornaműködés megértésében az ioncsatorna gátlók szerek specifikus kötődésük miatt struktúra-funkció vizsgálatra alkalmasak. A gátlók szerek kémiai összetételük alapján két csoportra oszthatók: a peptid és a nem peptid típusúakra. Az előbbi csoportba sorolhatók a különböző állatfajok (pl. skorpiók, kígyók) által termelt méreganyagok (venom), melyek nagy affinitással képesek kötődni a K^+ csatorna fehérjéhez (28; 71).

A peptid blokkolók többsége úgy fejt ki hatását, hogy a csatorna extracelluláris pórusába kötődve elzárják a K^+ ionok áthaladásának útját (pórus-blokkolók). Ismert szekvenciájú toxinok (ChTx) és a csatornafehérje együttes mutációja révén sikerült csatornapórus topológiájának és az egyes aminosavak toxin-csatorna kölcsönhatásban betöltött szerepének tisztázása (20; 72-77).

A peptid inhibitorok többségétől eltérő blokkolási mechanizmusa miatt nagy jelentőséggel bír egy pók venomból izolált toxin, a hanatoxin (HnTx). A HnTx nem a csatorna pórusába kötődik, hanem a *Shaker* csatorna S3 szegmensein található kötőhelyen keresztül módosítja a csatorna kapuzását, gátolva a K^+ áramot: a hanatoxin molekula kötődése a pozitív irányba tolja el a csatorna-aktiváció feszültség függését (gating-modifier: kapuzás-módosító hatású), ezáltal csökkentve az áram csúcserőértékét (78-80).

A peptid inhibitorok mellett a nem peptid típusú gátlószerek alkalmazása is jelentős előrelépést hozott a csatornafunkció, a kapuzási mechanizmusok felderítésében. Ezek a molekulák egyszerűbb szerkezetűek, eltérő a blokkolási mechanizmusuk és kötőhelyeik eltérő lokalizációja miatt bizonyultak alkalmasnak a viszonylag magas félhatásos koncentráció ellenére a struktúra-funkció feltérképezésében.

A K^+ csatornák egyik leggyakrabban használt nem peptid gátlószere a tetraetil-ammónium (TEA), melynek segítségével az N- és C-inaktiváció elkülöníthető, azáltal, hogy a *Shaker* csatornák extra- és intracelluláris pórusában is található TEA kötőhely (81; 82). A TEA molekula a *Shaker* csatorna nyitott pórusába kötődve blokkolja a kálium ionok áramát, és lelassítja az áram inaktivációját (83).

A nem peptid blokkolók között is található olyan vegyület, amely nem közvetlenül a pórus „eltömítése” révén, hanem bizonyos csatornafunkciók módosításán keresztül fejt ki hatását. Ulens és munkatársai HERG (**h**uman **e**ther-à-go-go (**eag**) **r**elated **g**ene) csatornákon kimutatták, hogy propoxyphene és annak metabolitja, a D-norpropoxyphene megváltoztatja a

csatorna kapuzását és szelektivitását (84). Ha a csatorna ionszelektivitását egy pontmutációval megszüntették, akkor a két gátlószernak semmiféle hatását nem tapasztalták.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1 Sejtek

Humán perifériás vérből izolált limfociták: A sejteket Ficoll gradiens centrifugálással nyertük heparinózott humán vérből. A vért egészséges donoroktól vettük. A limfocitákat kétszer mostuk Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes Hanks' oldattal, mely 25 mM HEPES-t is tartalmazott (pH: 7,4). A sejteket $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ koncentrációban 3-4 napig inkubáltuk 5% CO_2 mellett 37°C -on 24 lyukú tenyésztőedényekben. RPMI-1640 médiumot használtunk, mely 10% fetális borjú savót (Hyclone, Logan, Utah), 100 u./l penicillint, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycint és 2 mM L-glutamint tartalmazott.

A tenyésztő médiumhoz 2,5 vagy 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) adtunk a K^+ csatorna expresszió növelése érdekében (85-87).

***Xenopus laevis* oociták szeparálása:** Az oocitákat nőstény karmos békákból nyertük műtéti úton. A sejteket két órán keresztül Ca^{2+} -mentes ND-96 oldatban mostuk állandó forgatás mellett, mely oldat 2 mg/ml kollagenázt tartalmazott (88). Ezután a sejteket kétszer Ca^{2+} mentes ND-96 oldattal, kétszer pedig normál ND-96 oldattal mostuk. Az mikroinjektálást megelőzően a sejteket méret és kondíció szerint szelektáltuk, majd felhasználásukig antibiotikumot tartalmazó ND-96 oldatban tartottuk $18-20^\circ\text{C}$ -on.

III.2 Molekuláris biológia

Először a cTBAK-1 cDNS-t a Prof. Tytgat laboratóriumában kifejlesztett pGEMHE expressziós vektorba klónoztuk az eredeti pBLUEscript (Stratagene, USA)

vektorból (88). Y105F és F211Y mutációkat Quickchange mutagenézis kittel (Stratagene, U.S.A.) hoztuk létre az alábbi primerek felhasználásával: 5'-CACCACCATCGGCTTTGGCCATGCGGCGC-3' és 5'-CACCCCATCGGCTACGA ACTATGTGG-3'. A PCR beállítása során a gyártó cég által megadott protokollt alkalmaztuk. A PCR mutagenézis eredményességét enzim restrikciós módszerrel ellenőriztük (*Alw26 I* (Y105F) és *Bal I* (F211Y)). *In vitro* transzkripció előtt a pGEMHE/cTBAK-1 expressziós vektort (mutánst és vad-típust egyaránt) *Nhe I* enzim segítségével linearizáltuk, majd a T7 mMessage mMachine transzkripció kit (Ambion, U.S.A.) használatával capped cRNS-t szintetizáltunk a linearizált plazmidből. Az oocitákat 50 nl cRNS-sel (0,1 ng/nl) injektáltuk.

III.3 Koleszterin kivonás és bevitel

A PHA-P aktivált limfocitákat kétszer mostuk Hanks' oldattal, majd megfelelő koncentrációban (2×10^6 sejt/ml) felfuszpendáltuk metilált- β -cyclodextrin/koleszterin-t (M β CD/C, CycloLab, Hungary) vagy metilált- β -cyclodextrin-t (M β CD, CycloLab, Hungary) tartalmazó Hanks' oldatban. A sejtszuspenziót 60 percig 37°C-on inkubáltuk, majd Hanks' és PBS oldatban mostuk. Kontroll sejtek esetében M β CD/C vagy M β CD nélkül inkubáltuk a sejteket. Ezután a T sejteket antitest adhézións technikával szelektáltuk(14).

III.4 Elektrofiziológia

Patch-clamp: A tenyésztett limfocitákból a T-sejteket a mérések előtt a Matteson és Deutsch által leírt monoklonális antitest adhézións módszerrel szelektáltuk

egér anti-humán CD2-vel (14). A Petri-csészét borító kecske anti-egér IgG antitestek biztosították a megfelelő sejtek szelektív kitapadását. Az adhéziót követően a nem kötődő sejteket 3×1 ml normál külső oldattal történő mosással távolítottuk el.

Az értekezés eredményeit szolgáltató kísérletes munka nagy része a Hamill, Marty, Neher, Sakmann és Sigworth által 1981-ben bevezetett patch-clamp technikán alapul (89).

A méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük (89). A mérések a teljes-sejt konfiguráció elérése után 5-10 perc múlva kezdődtek. A kísérleteket minden esetben szobahőmérsékleten ($22-24^{\circ}\text{C}$) végeztük.

A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark Electromedical Instruments) üvegkapillárisokból húztuk két fázisban, majd hő alkalmazásával políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál extra- és intracelluláris oldat esetén 2-4 $\text{M}\Omega$ volt.

Méréseinkhez Axopatch 200 és 200A patch-clamp erősítőket használtunk feszültség-zár üzemmódban (Axon Instruments, Inc., USA). Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Digidata 1200 illesztőegységen keresztül a pCLAMP programcsomag segítségével (6.0 és 8.0 verziók). Nagy áramamplitúdó illetve soros ellenállás esetén soros ellenállás kompenzációt (60-85%) alkalmaztunk. Az áramgörbékét 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztük. A mintavételezés frekvenciája a szűrők sávszélességének legalább kétszerese volt, a Nyquist teória értelmében.

Kételelektrodás voltage-clamp technika: Az oocitákon átfolyó teljes-sejt áramot a hagyományos kételelektrodás voltage-clamp technikával mértük a mikroinjektálást követően 2-4 nappal. (GeneClamp 500, Axon Instruments, Inc., USA) Az elektródák ellenállását a lehető legalacsonyabb értéken tartottuk (kb. $200\text{k}\Omega$ - $1\text{M}\Omega$). A mérés

kezdetéig a sejteket gentamicint (50 mg/liter) tartalmazó ND-96 oldatban tároltuk. A pCLAMP 5.0 programot használtuk mintavételezésre. A további részletet lásd fenn a patch-clamp leírásnál.

III.5 Fluoreszcencia polarizációs anizotrópia mérések

Fluoreszcencia polarizációs anizotrópia méréseket az SFM 25 típusú spektrofluoriméterrel (Kontron) végeztük szobahőmérsékleten. 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene-p-toluenesulfonate-ot (TMA-DPH, Molecular Probes) dimetilsulfoxidban (DMSO)-ban oldottuk fel 0,5 mM-os törzsoldatot készítve. A kísérleteket megelőzően a sejteket (2×10^6 sejt /ml) 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk TMA-DPH-val ($2 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 360\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 430\text{nm}$). A fluorofór egyensúlyi fluoreszcencia anizotrópiáját a következők szerint határoztuk meg: $A = (I_{\text{VV}} - G \cdot I_{\text{VH}}) / (I_{\text{VV}} + 2 \cdot G \cdot I_{\text{VH}})$, ahol I_{VV} és I_{VH} rendre a mért fluoreszcencia intenzitások a polarizátor és az analizátor párhuzamos és merőleges beállításánál. A Perrin egyenlet $\left(\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{kT}{V\eta} \tau \right) \right)$ felhasználásával kifejeztük $A/(A_0 - A)$ -at, egy olyan mennyiséget amely egyenesen arányos a membrán viszkozitással (A_0 : a TMA-DPH határanizotrópiája, T: abszolút hőmérséklet, V: TMA-DPH térfogata, η : membrán viszkozitás, τ : TMA-DPH fluoreszcencia élettartama; $A_0(\text{TMA-DPH}) = 0.362$).

III.6 Oldatok

Limfocita mérések esetén: Az extracelluláris oldat összetétele (mM-ban): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35, 305 mOsm) volt. A

pipettaoldat összetétele (mM-ban): 140 KF, 11 K₂EGTA, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, és 10 HEPES (pH 7,20, 295 mOsm) volt.

A csatorna gátlószereket az alábbi módon adtuk a sejtekhez: a külső oldat folyamatos perfúziójával cseréltük a sejtet érő oldat összetételét. A folyadékáramlást a gravitáció hajtotta, az irányítást manuálisan csapokkal illetve elektromágneses szelepekkel végeztük. Az oldatok a sejttől <1mm-re elhelyezkedő kis átmérőjű, tölcséresített végű műanyag csőből folytak a sejtre. A folyadéktöbbletet folyamatos szívással távolítottuk el.

***Xenopus* oocitán történő mérés esetén:** Az alábbi extracelluláris oldatokat használtuk kísérleteink során:

1. ND-96; összetétel mM-ban: KCl 2, NaCl 96, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, HEPES 5, pH 7.4
2. magas kálium tartalmú oldat (HK); összetétel mM-ban: KCl 96, NaCl 2, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, HEPES 5, pH 7.4
3. 300 μM BaCl₂ tartalmazó HK oldat; összetétel mM-ban: KCl 96, NaCl 2, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, HEPES 5, 300 μM BaCl₂ pH 7.4
4. Na⁺ mentes oldat vagy TRIS oldat; összetétel mM-ban: KCl: 2, TRIS-Cl: 96, MgCl₂: 1, CaCl₂: 1.8, HEPES: 5, pH 7.4

Az oldatok cseréjét gravitáció hajtott perfúziós rendszerrel végeztük. Az elektródákat 3 M-os KCl oldattal töltöttük meg.

III.7 Az adatok kiértékelése

A mérések során nyert áramgörbéket a kiértékelés kezdetén szoftveresen korrigáltuk ohmikus szivárgási áramra, amennyiben ennek nagysága nem volt elhanyagolható. A görbéket digitálisan szűrőztük három pontos boxcar módszerrel.

A mért pontokhoz az egyes függvények illesztését a Marquardt-Levenberg algoritmus segítségével végeztük. Az illesztéseket a mért és számított adatpontok közötti különbségek négyzetének összegével jellemeztük.

A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását kétmintás t-próbával, vagy variációanalízissel (One-Way ANOVA) végeztük el. A Dunett vagy a Student-Newman-Keuls módszert alkalmaztuk annak megfelelően, hogy kontrol csoportos vagy pedig páronkénti összehasonlítás történt. A mérési adatoknál az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg legalább n=4 esetén.

III.8 Anyagok

A kísérletekben használt vegyszereket a következő forrásokból szereztük be:

- D-norpropoxyphene maleate: Sigma, U.S.A.
- fluoxetine HCl: ProzacTM, U.S.A.
- TMA-DPH: Molecular Probes, Netherlands
- a többi vegyszer: SIGMA Aldrich Kft, Magyarország.

A Pi1 toxinnal történő mérések esetén az extracelluláris oldat tartalmazott még 0,1 mg/ml BSA-t is, hogy csökkentsük a toxin műanyag felületekhez történő adszorpcióját. A D-norpropoxyphene maleate-ot és a fluoxetine HCl-ot ND-96 vagy TRIS oldatban oldottuk fel és 4°C-on tároltuk.

III.9 Skorpió toxinok

A felhasznált toxinok tisztítása kromatográfiás eljárással történt. A venomot a skorpióktól elektromos stimulációval nyertük. A skorpió méreg oldható frakcióit először Sephadex G-50-el töltött oszlopon szeparáltuk. A III. számú frakciót, amely az aktív peptid komponenseket tartalmazza nagynyomású folyadék kromatográfiával szubfrakciókra bontottuk (Pi1-Pi8). A tisztított peptid toxinok aminosav összetételét Beckmann 6300E aminosav analizátor, szekvenciáját pedig automatikus ProSequencer (Millipore, modell 6400/6600) segítségével határoztuk meg. A toxinok izolálását kollaborációs partnerünk (Dr. Possani) laboratóriumában végezték (90).

IV. EREDMÉNYEK

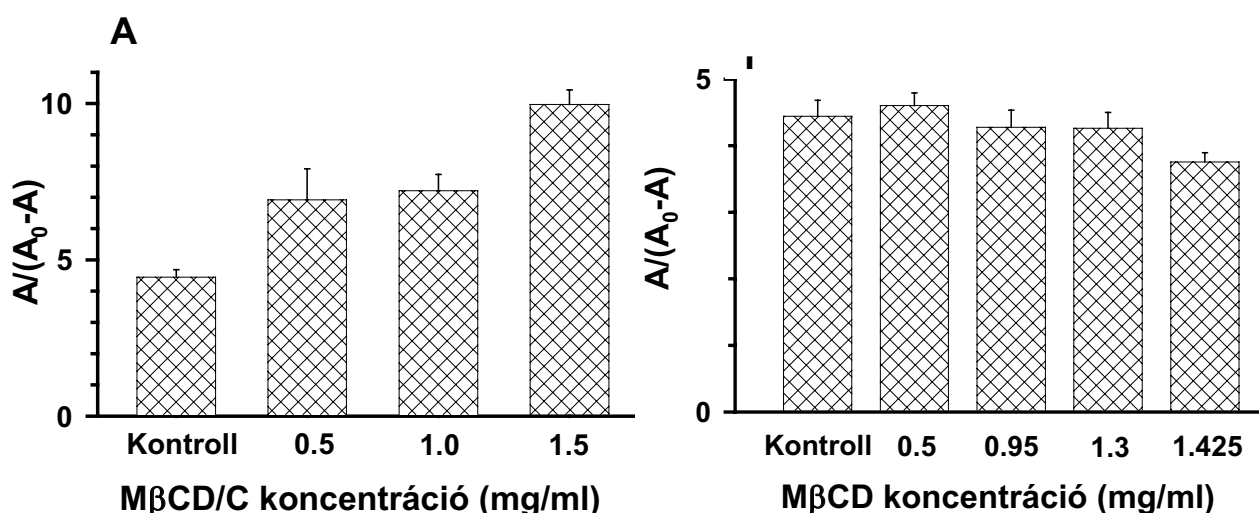
IV.1 A koleszterin hatása a Kv1.3 csatornák inaktivációs és aktivációs kapuzására

IV.1.1 A koleszterin hatása a membránfluiditásra

A koleszterin az emlős sejtek plazmamembránjának egyik fontos alkotóeleme, nélkülözhetetlen szerepet játszik a lipid molekulák alkotta membrán stabil szerkezetének kialakításában. A koleszterin kizárólag a membrán külső lipidrétegében található meg, ezen belül is legkoncentráltabban az ún. lipid tutajokban. Az elmúlt években számos közlemény beszámolt arról, hogy a különböző sejtek, így a limfociták membránjának koleszterintartalma és mikroviszkozitása korrelációban áll egymással. Kísérleteink során a metil- β -ciklodextrint (M β CD) és annak koleszterinnel telített komplexét (M β CD/C) használtuk, hogy a T limfociták membránjának koleszterintartalmának módosítására, a kezelés eredményességét és hatékonyságát „steady-state” fluoreszcencia anizotrópia méréssel ellenőriztük. Az 3. ábra **A** része azt mutatja, hogy a 0,5-1,5 mg/ml tartományban történő M β CD/C kezelés dózisfüggően növelte a T sejtek membránjának mikroviszkozitását. A hasonló koncentrációjú M β CD kezelés ellenben nem változtatta meg szignifikánsan a membrán fluiditását (3. ábra **B** része). A M β CD koncentráció növelésével a sejtek membránja oly mértékben károsodott, hogy az már nem tette lehetővé a patch-clamp kísérletek teljes-sejt konfigurációban való kivitelezését (személyes tapasztalat).

Mind a kezelt, mind a kontroll sejtek esetében meghatároztuk a kapacitásra normált áramsűrűséget ($\dot{A}S_i$: i az adott kezelést jelöli, $\dot{A}S_i = +40$ mV-nál mért

csúcsáram értéke / a sejt kapacitása), mely szintén jelzés lehet a M β CD és a M β CD/C kezelés hatékonyságára vonatkozóan. Hasonlóan a VRAC csatornákra kapott eredményekhez esetünkben is a koleszterin bevitele csökkentette ($\dot{A}S_{0,5} = 220 \pm 36$ pA/pF, $\dot{A}S_{1,0} = 113 \pm 16$ pA/pF, $\dot{A}S_{1,5} = 154.3 \pm 22$ pA/pF), míg membránból történő kivonása növelte ($\dot{A}S_{\text{kontroll}} = 326 \pm 37$ pA/pF, $\dot{A}S_{0,95} = 344 \pm 57$ pA/pF, $\dot{A}S_{1,425} = 639 \pm 95$ pA/pF) a Kv1.3 csatorna-aktivitást (ez esetben a Kruskal-Wallis-féle nem paraméteres próbát alkalmaztuk, $p=0.05$) (40).



3.ábra A koleszterin kivonás és bevétel hatása a T limfociták membrán-mikroviszkozitásra.

Fluoreszcencia polarizációs anizotrópia módszerrel vizsgáltuk a koleszterin bevétel (A) és kivonás (B) membránviszkozitásra kifejtett hatását. $A/(A_0-A)$, a viszkozitással (η) arányos mennyiséget a Perrin egyenletből határoztuk meg. ($A_0=0,362$, a TMA-DPH határanizotrópiája)

IV.1.2 A koleszterin módosítja a Kv1.3 csatorna inaktivációs kinetikáját

A Kv1.3 csatornák depolarizáció hatására gyorsan kinyitnak, amely megfelel a teljes-sejt konfigurációban mért áramgörbe felszálló ágának, majd egy nem vezető inaktivált állapotba jutnak, melyet az áram viszonylagos lassú exponenciálisan csökkenő szakasza jellemez a csatorna C-típusú (vagy lassú) inaktivációjának megfelelően. A 4. ábra A része olyan T limfocitákon mért teljes-sejt K^+ áramot mutat, amelyek rendre 1,5 mg/ml M β CD/C-nel (3), 1,425 mg/ml M β CD-nel (1) kezelt és

kontroll sejtekből (2) származnak. Méréseink során a sejtekből származó teljes-sejt áram csúcserőértékek különbözősége miatt a kapott áramgörbéket a maximális áramértékre normáltuk; mellesleg az ilyen módon előállt áramgörbék vizuálisan kiemelik a kezelések okozta változásokat. Az áramgörbe leszálló ágát egy exponenciális függvényvel illesztettük ($I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_{in,i}) + C$, I_0 : áram amplitúdója, $\tau_{in,i}$: az inaktivációs időállandó az „i” kezelés esetén, C : áram egyensúlyi értéke.), és az inaktiváció kinetikai jellemzésére az inaktivációs időállandót használtuk. Az egyes sejteket jellemző inaktivációs időállandót az egymást követő, 4 depolarizáció során meghatározott időállandók számtani átlagával jellemeztük.

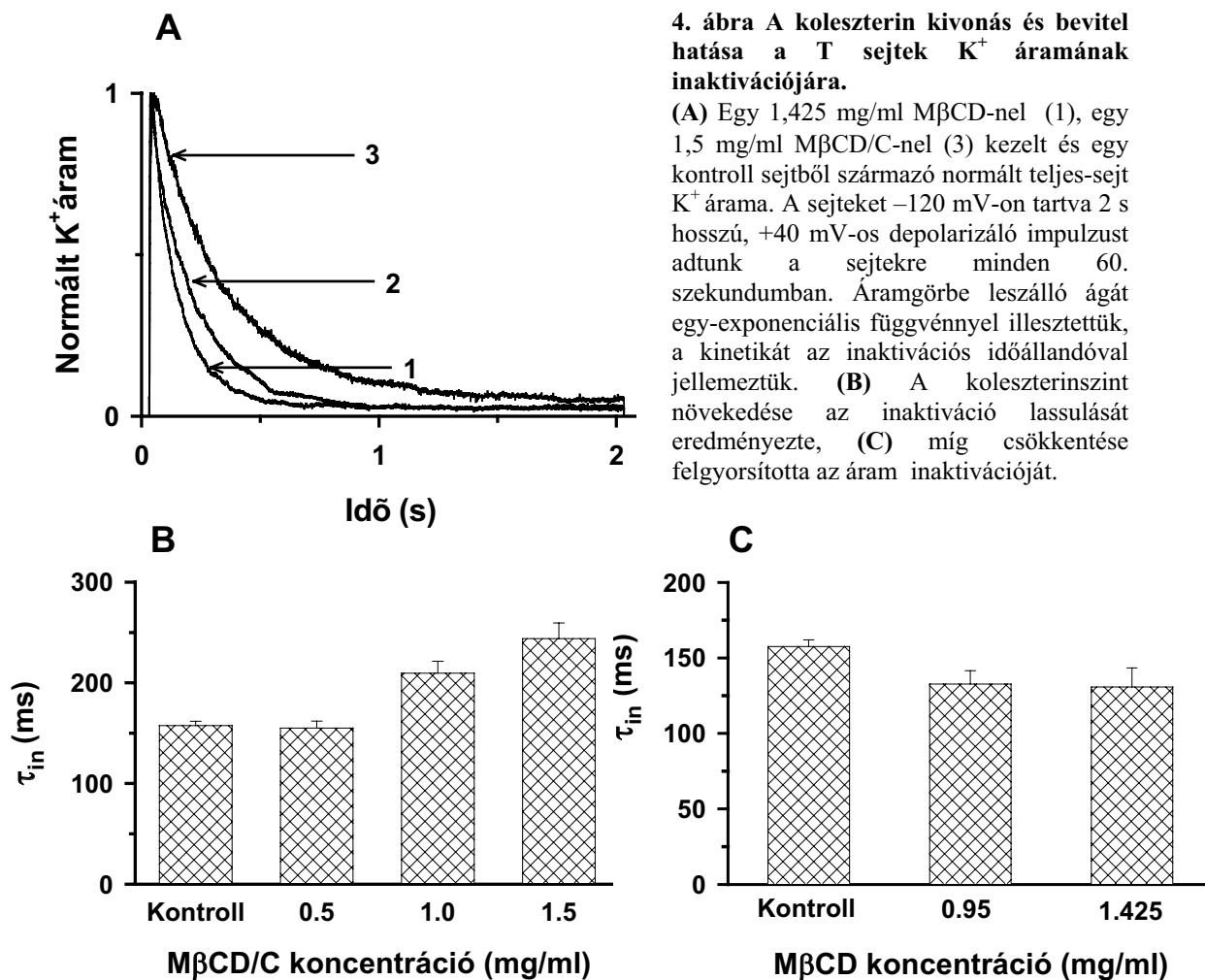
Mint azt a 4. ábra A része egyértelműen mutatja, a T sejtek membránjának M β CD-nel (0,95 és 1,425 mg/ml) történő koleszterin tartalom csökkentése az inaktiváció gyorsulását eredményezte, szemben a koleszterinszint emelésével (1 és 1,5 mg/ml), amely az inaktivációs időállandó szignifikáns növekedéséhez vezetett. A különböző M β CD és M β CD/C koncentrációjú kezelések során mért inaktivációs időállandóinak összehasonlítására statisztikai elemzést végeztünk. A különböző napokon mért kontroll sejtek adatait egy csoportba vontuk össze (később ezt tekintjük kontroll csoportnak), mivel az egyes napokon mért időállandók között nem találtunk szignifikáns különbséget ($\tau_{in,c} = 157,5 \pm 4,5$ ms, $n = 40$, $p = 0,124$). A statisztikai analízis alapján elmondhatjuk, hogy a 0,95 és 1,425 mg/ml M β CD-nel történt koleszterin kivonás az inaktivációs időállandó statisztikailag szignifikáns csökkenését eredményezte, azonban a két kezelt csoport között nem mutatkozott statisztikai különbség ($\tau_{in,0,95} = 132,8 \pm 8,8$ ms; $n = 9$; $\tau_{in,1,425} = 130,7 \pm 12,6$ ms, $n=7$; $p = 0,016$, $p = 0,76$; 4. ábra C rész).

Ha a sejteket 0,5 mg/ml M β CD/C-nel kezeltük, az áram inaktivációjának semminemű **változását** nem tapasztaltunk ($\tau_{in,0,5}=155,1\pm6,9$ ms, n=13, p=0,825), viszont a további koleszterinszint növelés (1 és 1.5 mg/ml M β CD/C) az inaktivációs időállandó jelentős és statisztikailag szignifikáns emelkedését eredményezte a kontrollhoz képest ($\tau_{in,1}=209,5\pm12$ ms, n=12; $\tau_{in,1,5}=237,2\pm15$ ms, n=10; p<0,001). A két utóbbi kezelés hatása viszont statisztikailag azonos volt (p=0,071; 4. ábra C rész).

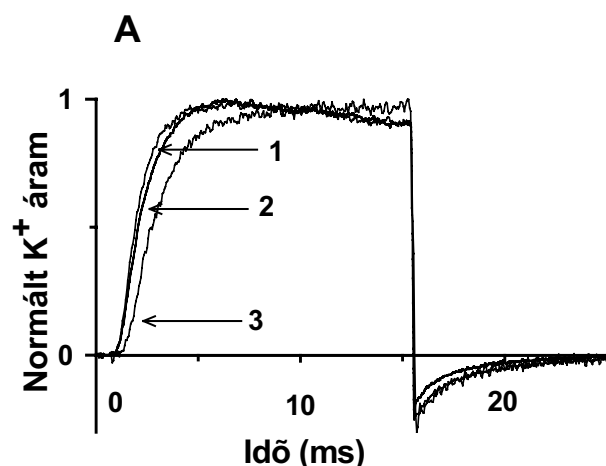
A 4. ábra A része továbbá azt is jelzi, hogy a csúcsáramra normált egyensúlyi áram értéke jelentősen megemelkedik a koleszterin bevitel hatására mind 1 (0,057 $\pm$ 0,01), mind 1,5 mg/ml (0,058 $\pm$ 0,01) M β CD/C koncentrációknál, a kontrollhoz viszonyítva (0,026 $\pm$ 0,003 p = 0,005). Az inaktivált és nyitott csatornák egyensúlyi eloszlásának eltolódása a depolarizációs feszültségek mellett a nyitott-inaktivált átmenetet jellemző sebességi állandók olyan megváltozását jelzi, amely szintén az áram inaktivációjának lassulását támasztja alá.

IV.1.3 A koleszterinszint emelés lassítja a Kv1.3 aktivációja

A Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramának aktivációját jellemző paraméterek meghatározására 15 ms ill. alkalmanként 30 ms hosszú, +50 mV-os depolarizáló impulzust alkalmaztunk, melyet minden 30-adik másodpercben kapcsoltuk a sejtekre, hogy a kumulatív inaktivációt kiküszöböljük. A 5. ábra A része olyan normált, aktivációt jellemző áramgörbéket mutat, melyeket egy kontroll (2), egy koleszterin kivonásnak (1,425 mg/ml M β CD) és töltésnek (1,5 mg/ml M β CD) alávetett limfocita esetén kaptunk. Az egyes sejteket jellemző aktivációs időállandót az inaktivációs időállandónál megadottal azonosan definiáltuk.

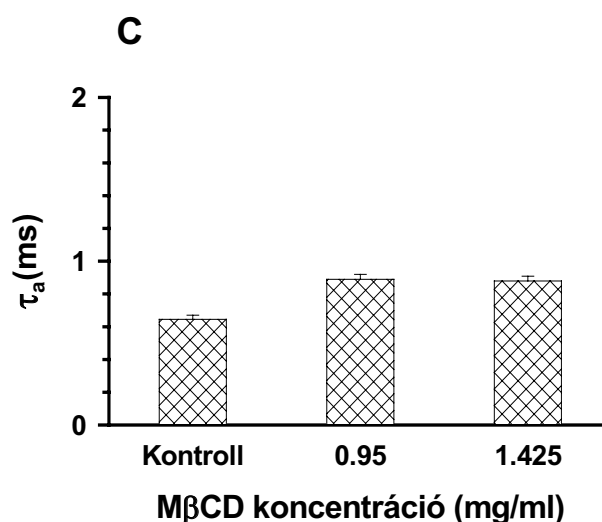
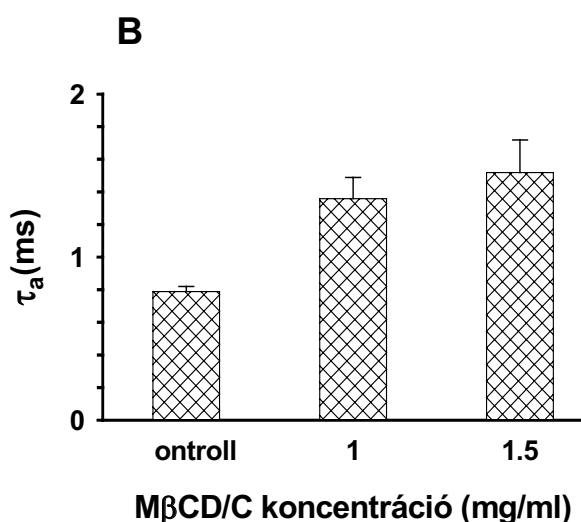


A koleszterin szint 1 és 1,5 mg/ml M β CD/C-nel való növelése, hasonlóan az inaktivációhoz, az áram aktivációjának lassulását eredményezte. Az aktivációt a Hodgkin-Huxley n^4 -es modellnek (HH-modell) megfelelően, exponenciálisan növekvő függvénnyel illesztettük: $I(t) = I_a \times (1 - \exp(-t/\tau_{a,i}))^4 + C$; ahol I_a az aktiválódó áram amplitúdója; $\tau_{a,i}$: aktivációs időállandó; C: az áram értéke a depolarizáló impulzus kezdetén (28). Az aktivációs állandók növekedése (5. ábra **B** rész) mindkét kezelés esetében szignifikáns eltérést mutatott a kontroll értékekhez képest, de a páronkénti összehasonlításra, csakúgy, mint az inaktivációnál, nem adódott különbség a két koleszterin szint hatása között. ($\tau_{a,c} = 0,79 \pm 0,03$ ms $\tau_{a,1,0} = 1,31 \pm 0,13$ ms $\tau_{a,1,5} = 1,52 \pm 0,2$ ms, $p < 0,001$).



5.ábra A koleszterin hatása a Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramának aktivációjára.

(A) Az Kv1.3 aktiváció kinetikájának a jellemzésére a sejteket -120 mV tartási potenciálról 15 vagy 30 ms-ig $+50$ mV-ra depolarizáltuk; on-line leak korrekciót alkalmaztunk. A membrán koleszterinnel történő töltése (1,5 mg/ml M β CD/C, 3) lassította az áram aktivációját, míg a koleszterin kivonás nem változtatta meg a görbe futását (1,425 mg/ml M β CD, 1) a kontrollhoz viszonyítva (2). (B-C) Az aktivációs görbe illesztésével kapott időállandó ($\tau_{a,i}$) változása a különböző kezelések hatására.



Ha a sejteket 1 ill. 1.5 mg/ml M β CD/C-nel inkubáltuk, akkor azt tapasztaltuk, hogy az aktiváció némely sejt esetében kétfázisúvá vált (6. ábra A rész, kontroll: 1; 1,5 mg/ml M β CD/C: 2). Ez esetben az aktivációs áramgörbét két exponenciális függvény összegfüggvényével illesztettük: $I(t) = I_{a,f} \times (1 - \exp(-t/\tau_{a,f}))^4 + I_{a,s} \times (1 - \exp(-t/\tau_{a,s}))^4 + C$, ahol $I_{a,f}$ és $I_{a,s}$ a gyors ill. lassú áramkomponens amplitúdója, $\tau_{a,f}$ and $\tau_{a,s}$ a két komponenshez tartozó időállandó és C az áramérték a $t=0$ időpillanatban. A statisztikai elemzések azt mutatták, hogy a kétfázisú aktiváció „gyors időállandója” ($\tau_{a,f}$) a kontroll aktivációs időállandóhoz képest szignifikánsan nőtt, azonban, mint előzőekben is tapasztaltuk, a két kezelést jellemző adatsor között nem volt statisztikai különbség

($\tau_{a,f;1,0} = 1,28 \pm 0,1$ ms $\tau_{a,f;1,5} = 1,44 \pm 0,2$ ms; $p < 0,001$ és $p = 0,582$). Mivel a lassan aktiválódó áramkomponens csak a koleszterinnel dúsított sejtek esetében jelenik meg, ezért csak a két kezelés ún. páronkénti összehasonlítása lehetséges, mely szintén nem tükrözött szignifikáns eltérést. ($\tau_{a,s;1,0} = 5,0 \pm 1,03$ ms; $\tau_{a,s;1,5} = 4,56 \pm 0,6$ ms, $p = 0,68$) Ezenfelül bevezettünk egy, a két komponens arányát jellemző **R** paramétert is, amely megadja a gyors komponensnek a két amplitúdó összegéhez viszonyított arányát, az alábbi egyenlettel definiálva:

$$R = \frac{I_{a,f}}{I_{a,s} + I_{a,f}}$$

A 6. ábra **C** részén szintén az látszik, hogy az 1 és 1,5 mg/ml M β CD/C-es kezelés hatása nem tér el egymástól (**R**_{1mg/ml} = 0,77 $\pm$ 0,04, **R**_{1,5mg/ml} = 0,85 $\pm$ 0,02, $p = 0,28$). A kétfázisú aktiváció okának pontosabb megértése végett megvizsgáltuk az áram aktivációját 0mV depolarizáló feszültség mellett is, és azt találtuk, hogy a mindkét kezelés esetében a 0 mV-nál meghatározott **R** értékek azonosak a + 50 mV-nál kapottakkal ($p = 0,436$ és $p = 0,646$; 6. ábra **C** része).

A M β CD-es kezelésnek alávetett limfociták kálium áramai gyakorlatilag azonos aktivációs kinetikát mutattak, mint a kontroll körülmények között tartott sejtek ($\tau_{a,0,95} = 0,89 \pm 0,03$ ms, $\tau_{a,1,425} = 0,88 \pm 0,03$ ms, $p=0,075$), az időállandók nem szignifikáns növekedése valószínűleg a kezelés aspecifikus hatásának tulajdonítható. (5. ábra **C** rész). Mind az inaktivációs, mind pedig az aktivációs kinetikára kapott eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a koleszterin kivonása, legalábbis ebben a koncentrációtartományban, nincs hatással a Kv1.3 csatornák kapuzási folyamataira. Ezzel szemben a koleszterinkoncentráció növelése során, a Kv1.3 aktivációs kinetikára

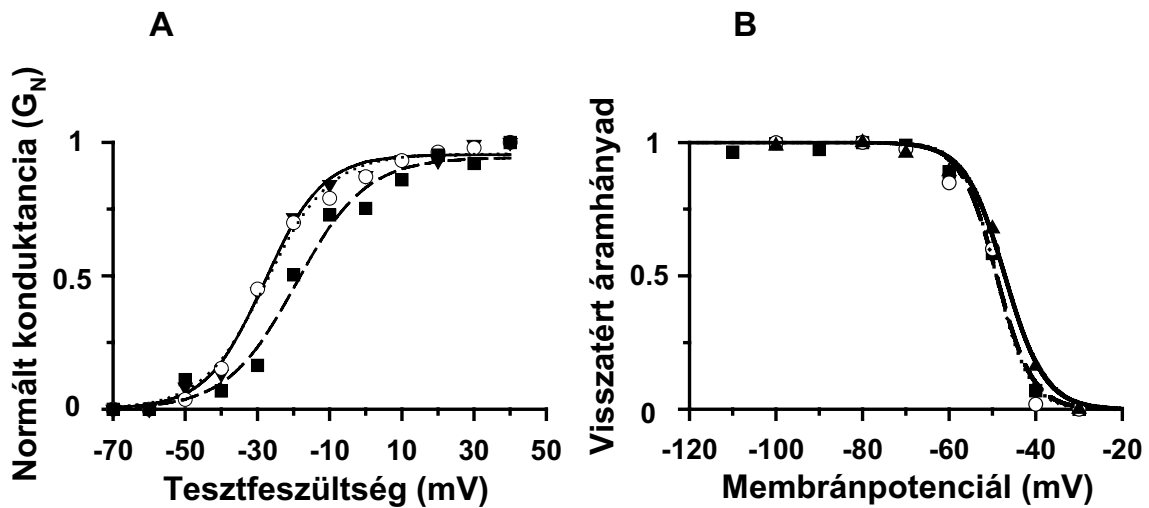
adódó eredmények azt jelezhetik, hogy a csatornák két különálló populációja jelent meg a T sejtek membránjában, amely feltételezhetően a membránban jelenlévő, eltérő lipid-koleszterin tartalmú fázisoknak tulajdonítható.

IV.1.4 Az aktiváció és inaktiváció egyensúlyi paraméterei

A koleszterin által módosított aktivációs és inaktivációs kinetika befolyásolhatja a két folyamatot jellemző egyensúlyi paramétereket, amelyek egyben tudósítanak a különböző konformációs állapotban (pl. nyitott-zárt, zárt-inaktivált) lévő csatornák egyensúlyi megoszlásáról. A normált teljes-sejt konduktancia (G_N) teszt feszültség függésével az aktivációt, az inaktivációból történő visszatérés egyensúlyi paramétere (visszatért áramhányad, RF) membránpotenciál függésének meghatározásával pedig az inaktivációt jellemeztük, majd az adatpontokhoz illesztett Boltzman függvények paramétereit használtuk a változások mértékének kifejezésére.

7. ábra három-három, eltérő módon kezelt limfocita (kontrol, 1,425 mg/ml M β CD és 1,5 mg/ml M β CD/C) normált konduktancia teszt feszültség (**A** rész), valamint a visszatért áramhányad membránpotenciál (**B** rész) függését szemlélteti (lásd még az ábramagyarázatot). Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének középpontja kontrol sejteknél ($V_{1/2,k}$) $-27,5 \pm 1,2$ mV ($n=24$) volt, mely a membrán koleszterinszint-növelés hatására (1 ill. 1,5 mg/ml M β CD/C) szignifikánsan nőtt: $-20,2 \pm 2,0$ mV és $-20,9 \pm 1,3$ mV ($n=7$, $p = 0,002$). Ezenfelül, a meredekség a kontrolnál kapott $8,32 \pm 0,2$ mV-ról $10,1 \pm 0,56$ mV (1 mg/ml) ill. $9,61 \pm 0,26$ mV-ra (1,5 mg/ml) változott ($p = 0,002$). Mint azt előzőleg már tapasztalhattuk, a koleszterin kivonása nem okozott változást az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésében sem ($s_{a;0,95} = 8,8 \pm 0,5$ mV, $s_{a;1,425} = 8,3 \pm 0,2$ mV; $V_{1/2,a,0,95} = -28,0 \pm 1,3$ mV, $V_{1/2,a,1,425} = -30,2 \pm 1,4$ mV; $p = 0,569$ és $p = 0,651$).

A visszatért áramhányad membránpotenciál függését, amely az inaktivált és zárt csatornák arányát jellemzi egy adott tartófeszültség értéken, a 7. ábra **B** része mutatja. Alaposabb statisztikai analízis nélkül is egyértelmű, hogy a koleszterinszint változtatása nincs hatással sem a középpont helyzetére, sem pedig az illesztett függvény meredekségére ($V_{1/2,i,k} = -47,4 \pm 0,8$ mV $V_{1/2,i,1,5} = -53,5 \pm 2,8$ mV, $V_{1/2,i,1,425} = -48,5 \pm 0,1$ mV, $p = 0,16$ és $p = 0,514$; $s_{i,k} = -5,0 \pm 0,4$ mV, $s_{i,1,5} = -4,7 \pm 0,5$ mV, $s_{i,1,425} = -3,5 \pm 0,5$ mV, $p = 0,632$ és $p = 0,439$).



7. ábra A koleszterin hatása a Kv1.3 csatornák feszültségfüggő egyensúlyi paramétereire

(A) A K^+ áram egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggése egy kontroll (?) egy MβCD (1,425 mg/ml, ?) és egy MβCD/C (1,5 mg/ml, ?) kezelt sejten. A sejteket -120 mV-on tartva 40 ms-ig a feltüntetett teszt-feszültségre depolarizáltuk minden 50. sec.-ban. A teljes-sejt konduktanciát a $G(V)$ $G = I_{max}/(V - E_{rev})$ egyenlettel definiáltuk, ahol I_{max} a V_{teszt} teszt-feszültségnél mért áram csúcserő, E_{rev} pedig az áram megfordulási potenciálja. A $G(V)$ értékeket a maximális értékre normalva a feszültség függvényében ábrázoltuk, majd a legjobban illeszkedő Boltzmann függvényvel ($G(V) = 1/(1 + \exp[-(V - V_{1/2,a})/s_a])$, ahol V a teszt-feszültség, $V_{1/2,a}$ a függvény középpontja, s_a a meredeksége) együtt ábrázoltuk (folytonos vonal: kontroll; pontvonal: 1,425 mg/ml MβCD; szaggatott vonal: 1,5 mg/ml MβCD/C). (B) A visszatért áramhányad feszültség függése egy kontroll (?) egy koleszterin töltött (1.5 mg/ml MβCD/C, ?) és koleszterin kivont (1.425 mg/ml MβCD, ?) limfocitán. A visszatért áramhányad meghatározására a szokásos két-impulzus protokollt alkalmaztunk: a sejteket -120 mV-on tartva $+40$ mV-ra depolarizáltuk, majd 180 s-ig a kívánt feszültségen (-110 mV - -30 mV) tartva ismét $+40$ mV-ra depolarizáltuk. A visszatért áramhányadot (RF) az alábbi egyenlettel adtuk meg: $RF = (P_2 - I_{ss1})/(P_1 - I_{ss1})$, ahol P_2 és P_1 a csúcserő az első ill. a második impulzus során, I_{ss1} az áram értéke az első impulzus végén. Az adatpontokhoz szintén Boltzmann függvényt illesztettünk, melyet azonos módon ábrázoltunk, mint az előzőekben. Szemben a egyensúlyi aktivációval, a membrán koleszterintartalma nem volt hatással a visszatért áramhányad feszültségfüggésére.

IV.2 A Pi1 toxin hatása a Kv1.3 csatornák áramára

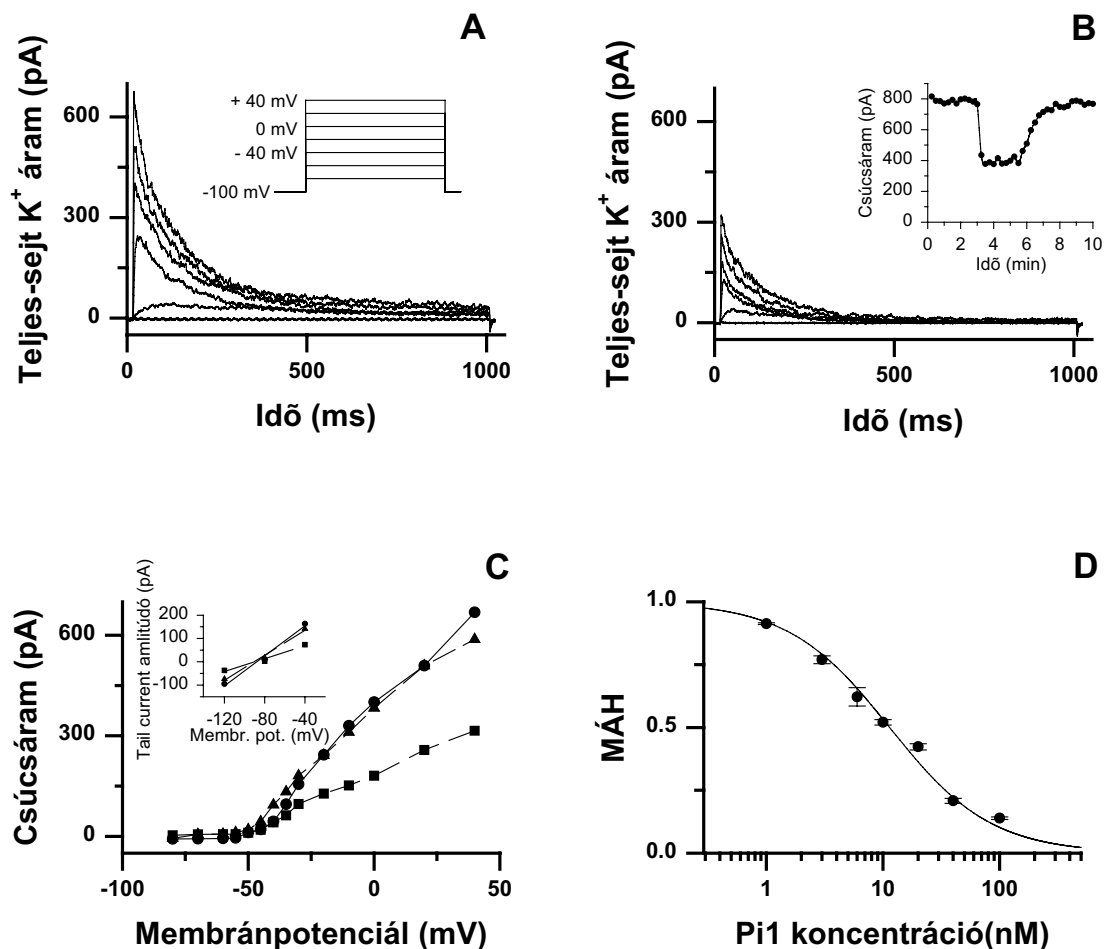
A különböző állatfajok venomjából kinyert toxinok lehetőséget nyújtanak az ioncsatornák farmakológia és csatorna-funkció vizsgálatára. Az általunk vizsgált Pi1 toxin a *Pandinus imperator* skorpió venomjából (PiV) származik a Pi család többi tagjával (1-8) együtt. Korábbi kísérleteinkben már kimutattuk, hogy a PiV-ből tisztított két toxin frakció, a Pi2 és Pi3 gátolja a Kv1.3 csatornák teljes sejt áramát (91; 92). A Pi1 toxin egy jellegzetes motívumban eltér a többi frakciótól: az oligopeptid stabilitását a megszokott három diszulfid helyett egy extra negyedik biztosítja, amely összekapcsolja az α -hélix és a β -lemez közti hurkot a C-terminussal. A kiegészítő ciszteinek megléte feltételezi a molekula stabilabb struktúráját, valamint a méret csökkenését, mely maga után vonhatja a toxin-csatorna kölcsönhatás, s ezáltal a gátlás erősségének a megváltozását.

A 8. ábra **A** része humán perifériás T limfocitákon mérhető, Kv1.3 csatornáktól származó teljes-sejt áramgörbéket mutat eltérő depolarizáló feszültségeknél, normál extracelluláris oldatban. Látható, hogy kizárólag kifelé irányuló áram folyik a membránon keresztül, melyet K^+ ionok hoznak létre. Ha az extracelluláris oldat 10 nM Pi1 toxint tartalmaz, a teljes-sejt K^+ csúcsáram értékek szignifikánsan lecsökkennek (kb. 50%-ra), anélkül, hogy az áram inaktivációs és aktivációs kinetikája módosulna (8. ábra **A** és **B** rész). A toxin bekötődésének és kimosásának kinetikáját rövid (6ms) +40 mV-ra depolarizáló, egymást 15 sec-ként követő impulzusokkal vizsgáltuk. 10 nM Pi1 általi egyensúlyi gátlás gyakorlatilag két impulzus közti (≈ 15 s) időtartam alatt kialakult, viszont a toxinmentes oldattal perfundálva a sejteket az áram kontroll értékre történő visszatérése meglehetősen lassú, megközelítőleg 2 percet vesz igénybe (8. ábra **B** rész, betétábra).

A csúcsáram feszültségfüggése (I-V függvény) jól szemlélteti (8. ábra **C** rész), hogy a csatornák aktivációját jellemző egyensúlyi paraméterek nem változnak meg a toxin kötődés hatására, amely a gátlás kialakulásának feszültség-független voltát igazolja. Tail-current protokoll során a sejteket -120 mV tartófeszültségről 6 ms hosszúságú $+40$ mV-os impulzussal depolarizáltuk, majd a feltüntetett feszültségekre repolarizáltunk, és meghatároztuk az áramamplitúdókat (8. ábra **C** rész, betétábra). Az áram megfordulási potenciálja a Pi1 kötődés hatására nem változott jelezve, hogy a toxinmolekula nem befolyásolja a csatorna szelektivitását.

A fentiekben foglaltak alapján azt mondhatjuk, hogy a Pi1, hasonlóan a legtöbb peptid gátlószerhez, nem befolyásolja a csatorna kapuzását, pusztán a csatorna pórus külső extracelluláris részébe bekötődve akadályozza a K^+ ionok az ioncsatorna póruson keresztül történő átáramlását.

Az 1-100 nM koncentráció tartományban meghatároztuk a K^+ áram gátlásának a Pi1 koncentráció függését (8. ábra **D** része). A megmaradó áramhányad értékeket ($M\acute{A}H = I_{Pi1}/I_0$, ahol I_{Pi1} és I_0 az áram csúcsértéke az adott koncentrációjú Pi1 jelenlétében ill. normál extracelluláris oldatban) 1 toxin molekula : 1 csatorna sztöchiometriát feltételezve megillesztettük ($M\acute{A}H = K_d/(K_d + [Pi1])$), ahol K_d : disszociációs állandó, $[Pi1]$: Pi1 koncentráció). Az illesztés eredményként a toxin félhatásos koncentrációjára 11.4 nM adódott. Ezt azt jelzi, hogy az extra diszulfid híd megléte nem befolyásolja a kötődés erősségét.



8. ábra Pi1 reverzibilisen blokkolja a humán T limfociták K⁺ áramát

(A) Egy T sejt K⁺ áramának feszültségfüggése. A sejteket -120 mV-on tartva a betétábrán jelzett feszültségekre depolarizáltuk (-80 - +40 mV) 1000 ms-ig. Az egyes impulzusokat 80 s választotta el. Az áttekinthetőség kedvéért nem minden áramgörbét tüntetünk fel. (B) Ugyanazon a sejten mért áramok, mint az (A) részben, azonban most 10 nM Pi1-et alkalmaztunk extracellulárisan. **Betétábra:** Egy limfocita teljes-sejt áramamplitúdójának változása 10 nM Pi1 hozzáadása majd kimosása során. A 6 ms hosszú +50 mV-os tesztimpulzusokat 15 sec-ként kapcsoljuk a sejtekre. (C) Az extracellulárisan alkalmazott Pi1 hatása a limfociták teljes-sejt áramának a feszültségfüggésére. (●: kontroll, ■: 10 nM Pi1, ▲: kimosás után) Leak korrekciót nem alkalmaztunk. **Betétábra:** A 10 nM Pi1 nem befolyásolja a K⁺ áram megfordítási potenciálját. A sejteket -100 mV tartófeszültségre 6 ms hosszúságú +40 mV impulzussal depolarizáltuk, majd visszaléptünk az ábrán jelzett teszt-feszültségre, ahol megmértük az áramamplitúdót. Az impulzusokat 40 sec választotta el. (D) A Pi1 dózisfüggő módon gátolta a K⁺ csatornák áramát. (n=4) A megmaradó áramhányad (MÁH) értéket a $MÁH = I_{Pi1}/I_0$ egyenlettel adtuk meg, ahol I_{Pi1} és I_0 az áram csúcsértéke az adott koncentrációjú Pi1 jelenlétében ill. normál extracelluláris oldatban. 1:1 sztöchiometriájú csatorna-toxin molekula model alapján illesztettük a dózis-hatás görbét az adatpontokhoz.

IV.3 Gátlószer és mutagenesis indukált szelektivitásváltozás a cTBAK K⁺ csatornában

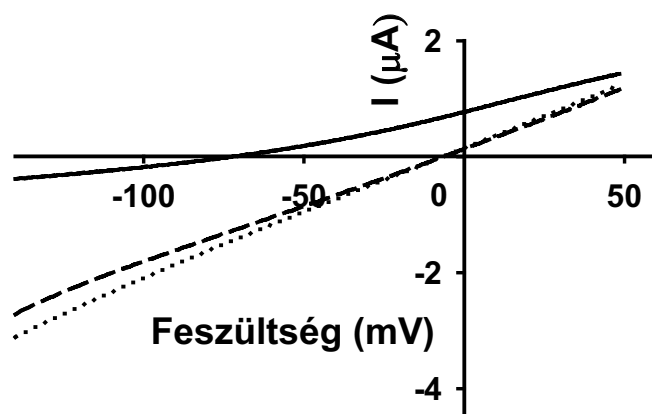
IV.3.1 A D-norpropoxyphene és fluoxetine élettani hatása

A fluoxetine (Prozac[®], *FL*), amely jól ismert antidepresszáns hatású vegyület, egyrésztől gátolja a szerotonin felvételt a központi idegrendszerben, másrésztől nemkívánatos mellékhatásaként jelentkezhet a legkülönbözőbb ioncsatornák nem-specifikus, feszültségfüggő vagy független, gyakran irreverzibilis gátlása (10. ábra **B** rész) (93-97). A D-norpropoxyphene (*NORP*, Darvon[®], 10. ábra **A** rész) az érzéstelenítés során alkalmazott propoxyphene I. fázisú metabolitja, melynek a szív sejtjeiben történő felhalmozódása toxikus mellékhatásokat implicál a HERG és egyéb csatornák funkciójának módosítása révén (84; 98; 99). Ulens és munkatársai mutatták ki, hogy a HERG csatornák kapuzását és ionszelektivitását is módosítja a *NORP*, szemben a Kv1.1-gyel, ahol hasonló hatást nem tapasztaltak(84). Az általunk *Xenopus laevis* oocitákban kifejezett cTBAK-1 csatorna szintén a szívben található (myocitákban), így feltételezhető, hogy a két vegyület a korábbiakban megismert hatással van rá.

IV.3.2 cTBAK-1 áram jellemzői *Xenopus laevis* oocitában

Kettő-négy nappal a *Xenopus laevis* oociták cTBAK-1 csatornát kódoló cRNS-sel történő injektálását követően végeztük a méréseinket két-elektrodás feszültség-zár konfigurációban. Az elektrofiziológiai kísérletek során az oocitákra 0 mV tartópotenciál mellett –150-tól +50mV-ig tartó 1 s hosszú ún. feszültség-rámpa impulzust kapcsoltunk minden 10. másodpercben. (A feszültség-rámpa impulzus során a tartófeszültség lineárisan változik az idő függvényében a két szélsőérték között.) Ezen protokoll

alkalmazásával a cTBAK-1 csatornákra jellemző teljes-sejt áram membránpotenciál függését (I-V görbe) határoztuk meg, mivel a csatornák minden feszültség érték mellett nyitva vannak, valamint nem lép fel inaktiváció (szemben pl. a Kv 1.3-mal, lásd az első részt). A 9. ábra olyan reprezentatív áramgörbéket mutat, melyeket az előbbieken ismertetett protokoll alkalmazásával kaptunk a sejt ND-96 (folytonos vonal), HK (pontvonal) és Ba^{2+} (szaggatott vonal) oldattal történő perfúziójakor. A három áramgörbe alapján elmondható, hogy a cTBAK-1 csatorna árama ND-96 oldatban kifelé egyenirányító, mely szimmetrikus K^+ koncentrációk mellett eltűnik, ezenfelül a Ba^{2+} ionok alacsony gátló hatása azt jelzi, hogy nem az IRK csatornák családjába tartozik (100). Ezek az eredmények egy K^+ szelektív, Goldman-Hodgkin-Katz- (GHK) vagy nyitott-egyenirányító (open-rectifier) csatornát jellemeznek, mint azt Kim és munkatársai korábban leírták (61).



9. ábra cTBAK-1 csatornák árama *Xenopus laevis* oocitákban, két-elektrodás feszültség-zár konfigurációban. A cTBAK cRNS-sel injektált sejtekre 0 mV tartási potenciálról -150 mV-től $+50$ mV-ig terjedő feszültség-rámpa impulzust kapcsoltunk 1 sec.-ig. Az impulzusok között 10 s-ot vártunk. Az ND-96 (folytonos vonal), HK (pontvonal) és Ba^{2+} (szaggatott vonal) oldatban mért áramgörbék egy GHK-rectifikáló csatornát jellemeznek.

IV.3.3 NORP indukált szelektivitásváltozás

A 10. ábra C része cTBAK-1 csatornák teljes-sejt áramát mutatja kontroll körülmények között (ND-96 oldatban), valamint $250 \mu M$ NORP hozzáadását követően. Ugyanezen a sejten $+50$ mV-nál mért áramértékek időbeli változását tüntettük fel a betétábrán: a gátlószer bemosódási kinetikája meglehetősen lassú, míg a kimosás sem

volt teljes, azaz a *NORP* irreverzibilisen blokkolja a csatornák áramát (a két impulzus közti időtartam 10 s). Az áram-tesztfeszültség (I-V görbe) görbék jól illusztrálják, hogy a *NORP* hatása összetett: csökkenti a kifelé irányuló áramot, megnöveli az befelé irányulót és eltolja az I-V függvényt a pozitív feszültségek felé, mely az áram megfordulási potenciáljának az eltolódását jelenti. A megfordítási potenciál (E_{rev}) koncentráció függésének meghatározásakor bevezettük az ún. normált vagy relatív megfordítási potenciál eltolódást (ΔE_{rel}), hogy ily módon kiküszöböljük a csatornák eltérő expressziós szintjéből adódó variabilitást:

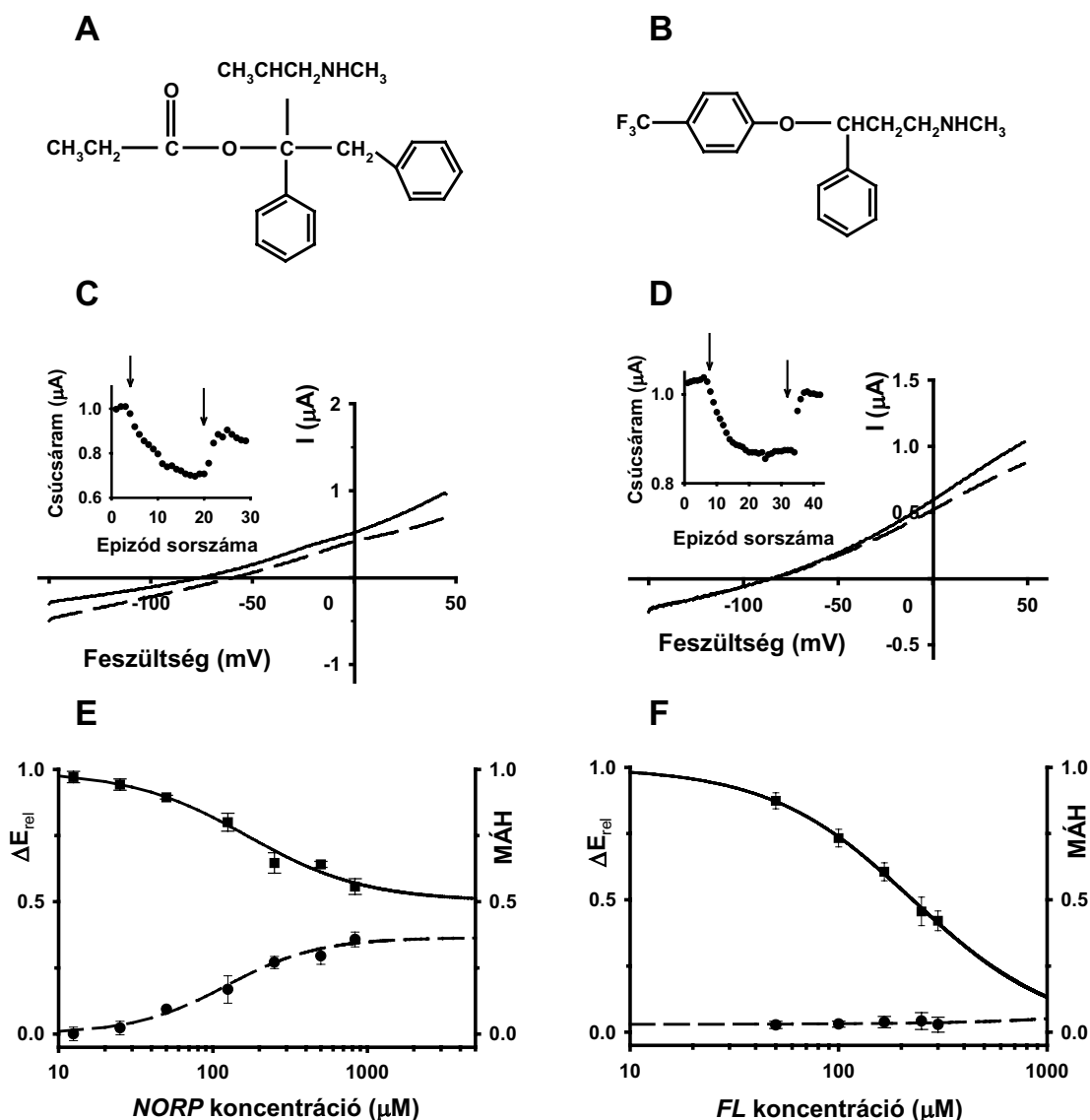
$$\Delta E_{rel} = \frac{E_{NORP} - E_{ND-96}}{E_{ND-96}} = \frac{\Delta E_{rev}}{E_{ND-96}}$$

ahol E_{NORP} és E_{ND-96} az áram megfordítási potenciálja *NORP* jelenlétében ill. ND-96 oldatban. A különböző *NORP* koncentrációknál meghatározott ΔE_{rel} értékeket Hill egyenlettel illesztettük $\left(\Delta E_{rel} = \Delta E_{rel,max} \cdot EC_{50}^n / (EC_{50}^n + [NORP]^n) \right)$, és eredményeképpen az illesztés paramétereire a következők adódtak: $EC_{50}=122,1 \mu M$ (megfordítási potenciálra vonatkozó félhatásos koncentráció), ΔE_{rel} maximális értéke ($\Delta E_{rel,ND-96,max}$) 0,36 és a Hill koefficiens -1,45 ($[NORP]$: *NORP* koncentráció, 10. ábra C rész)

Tekintettel arra, hogy a *NORP* csak részlegesen gátolta cTBAK-1 áramot +50 mV-nál, a megmaradó áramhányad (MÁH) koncentráció függését olyan Hill egyenlettel illesztettük, melynek a végtelen nagy koncentrációk esetén sem zérus a nem blokkolt áramhányad értéke (NB): $MÁH = B \cdot IC_{50}^n / (IC_{50}^n + [NORP]^n) + NB$ (IC_{50} (áram blokkolását jellemző félhatásos koncentráció) = 167,8 μM , B (blokkolt áramhányad) = 0,51, NB = 0,49, n = 1,1; 10. ábra E rész). A kifelé irányuló áram gátlásának nem teljes volta kétféleképpen magyarázható: (1) a membránban legalább kettő, eltérő

farmakológiai tulajdonságú csatornapopuláció van jelen; (2) a *NORP* nem csak a csatornán átfolyó áramot gátolja, mint egy pórusblokkoló, hanem valószínűleg módosítja a csatorna funkcióját, ez esetben a szelektivitását (az áram-feszültség görbe eltolódása is utal erre). Az első magyarázat kizárható, mivel a nem cTBAK RNS-sel injektált *Xenopus* oocitákból származó áramot nem módosította a *NORP* (itt hivatkozunk (84) referenciára), az utóbbit feltételezést pedig az oldat Na^+ ionjainak a kivonásával, izoozmotikus helyettesítésével (pl. TRIS) vizsgáltuk (lásd a következő fejezetet).

A *NORP*-nal végzett kísérleteinkkel párhuzamosan a fluoxetine (*FL*) cTBAK-1 csatornákra kifejtett hatását is tanulmányoztuk. Az irodalomból már korábbról ismert volt, hogy a *FL* az ioncsatornák széles spektrumára fejt ki gátlóhatást: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- csatornákról is bizonyították, hogy a különféle módon és hatásfokkal blokkolódnak *FL* jelenlétében (93-96). Ezek alapján feltételeztük, hogy a cTBAK-1 csatornát is képes - nem specifikus volta miatt – gátolni. A 10. ábra **D** részén az előzőleg ismertetett 1 sec hosszú feszültség-rámpa protokoll során nyert áramgörbék láthatók ND-96 oldatban és 50 μM *FL* alkalmazásakor. Hasonlóan a *NORP*-hoz, a *FL* is irreverzibilis gátlószernek bizonyult (10. ábra **D** rész, betétábra), viszont a *NORP*-nal ellentétben, nem módosítja az E_{rev} -t; valószínűleg csak a csatorna vezetőképességét csökkenti a pórus eltömítése révén. A dózis-hatás görbe egyértelműen azt mutatja, hogy a *FL* nem tekinthető a cTBAK-1 hatékony gátlószerének a 226,5 μM félhatásos koncentrációjával ($n=1,3$; 10. ábra **F** rész). Természetesen, ez esetben is Hill egyenletet illesztettünk $\left(\text{RF} = \text{IC}_{50}^n / (\text{IC}_{50}^n + [\text{FL}]) \right)$ az egyes koncentrációknál mért MÁH értékekhez, s a *NORP* esetében ismertetett módon származtattuk a MÁH-ot.

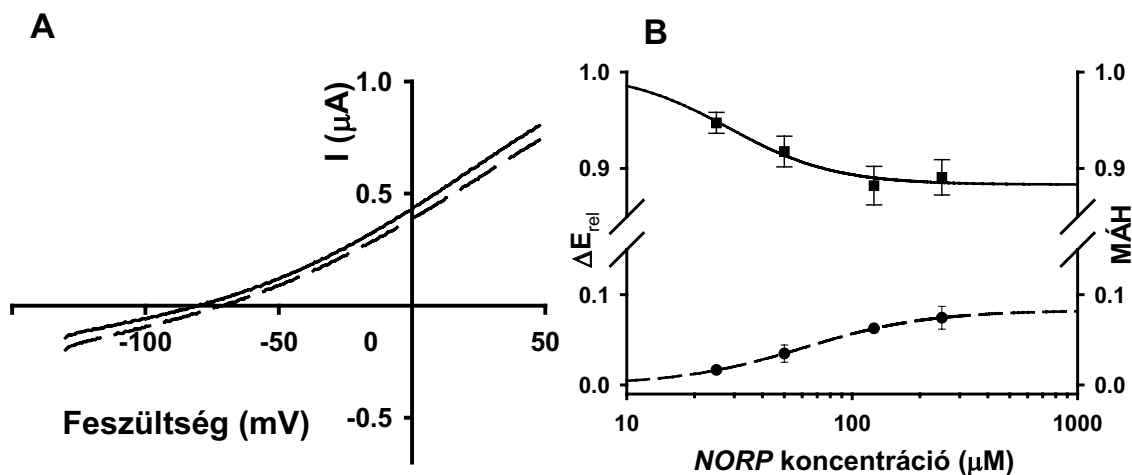


10.ábra A NORP és a FL módosítja a cTBAK-1 áramát.

(A és B) A D-norpropoxyphenone ill. a fluoxetine szerkezete. (C) Reprezentatív cTBAK-1 áramgörbék ND-96 oldatban (folytonos vonal) és 250 μM NORP (szaggatott vonal) hozzáadása után. A betétábra jól szemlélteti, hogy a gátlószer bemosódása meglehetősen lassú (10 s-os intervallumok két epizód között), valamint a kimosódás nem volt teljes. A NORP gátolta a kifelé irányuló K^+ áramot, stimulálta az ionok beáramlását és megnövelte a megfordítási potenciált (E_{rev}). (D) A FL extracelluláris alkalmazása elsősorban a kifelé irányuló K^+ áramot gátolta. Az áramgörbéket ND-96 (folytonos vonal) oldatban és 50 μM FL jelenlétében (szaggatott vonal) rögzítettük. **Betétábra:** A NORP-hoz hasonlóan a gátlóhatás nem volt kimosható ($[\text{FL}]=50 \mu\text{M}$). (E) A NORP koncentrációfüggő módon fejtette ki hatását. A megfordítási potenciálban bekövetkező változást a sejtenkénti variabilitás miatt normáltuk (ΔE_{rel} , ●), az adatpontokhoz Hill függvényt illesztettünk. A NORP csak részlegesen gátolta a cTBAK-1 csatorna áramát +50 mV-nál. A megmaradó áramhányadot (MÁH, ■) $I_{\text{NORP}}/I_{\text{ND-96}}$ képlettel adtuk meg, ahol I_{NORP} és $I_{\text{ND-96}}$ az áramérték +50 mV-nál a feltüntetett [NORP] jelenlétében ill. ND-96-ban. (F) A FL koncentráció függő áramgátlását (MÁH, ■) Hill egyenlettel illesztettük, mely $\text{IC}_{50} = 226,5 \mu\text{M}$ eredményezett. A FL alkalmazásakor mért normált E_{rev} változásokat (ΔE_{rel} , ●) is ábrázoltuk, hogy ezáltal kiemeljük a két gyűület eltérő hatását.

IV.3.4 A *NORP* hatása csökken az extracelluláris Na^+ hiányában

A *NORP* alkalmazása, mint előbb láttuk, megváltoztatja a cTBAK-1 csatorna szelektivitási tulajdonságait: a befelé irányuló áram amplitúdója és az E_{rev} megnő, a kifelé irányuló áram pedig lecsökken. A tapasztalt jelenség magyarázatáért valószínűleg a Na^+ ionok megváltozott befelé irányuló áramlása tehető felelőssé. A Na^+ ionok szerepének tisztázása céljából az extracelluláris oldatban a Na^+ -ot TRIS ionokkal helyettesítettük, amelyre nézve mind a sejtmembrán, mind a cTBAK-1 csatorna inpermeábilis.



11. ábra *NORP* megváltoztatja a Na^+ és K^+ ionok relatív permeabilitási együtthatóit.

(A) Az extracelluláris oldatban Na^+ TRIS-sel történő helyettesítése jelentősen, bár nem teljes mértékben csökkentette az E_{rev} eltolódását a pozitív potenciálok felé. (B) A *NORP* dózis-függő változást hozott létre az E_{rev} -ben (ΔE_{rel} , ●), melyet szintén Hill egyenlettel illesztettük. A *NORP* áramamplitúdóra kifejtett gátlóhatása (MÁH, ■) szintén koncentrációfüggő volt, a MÁH-t az előzőekben ismertetett módon származtattuk.

A 11. ábra A része olyan cTBAK-1 áramgörbéket mutat, melyek Na^+ -ot nem tartalmazó TRIS oldatban (folytonos vonal) és ezen oldatban feloldott 250 μM *NORP* hozzáadása után (szaggatott vonal) lettek rögzítve, ugyanazon a sejten. A *NORP* E_{rev} -re kifejtett hatása szembetűnő módon redukálódott, bár TRIS oldatban sem vált teljesen zérussá, valamint hasonlóan a ND-96 oldatban kapott eredményeinkhez, dózisfüggést

tanúsított. A korábban ismertetett módszerrel illesztettük a ΔE_{rel} és MÁH-hoz tartozó adatpontokat, mely az illesztés paramétereire az alábbi értékeket szolgáltatatta: $EC_{50, \text{TRIS}} = 61 \mu\text{M}$, $\Delta E_{\text{rel, TRIS, max}} = 0,083$, $n_{\text{TRIS}} = 1,57$; valamint $IC_{50, \text{TRIS}} = 38,4 \mu\text{M}$, $n_{\text{TRIS}} = 1,86$, $NB_{\text{TRIS}} = 0,87$, $B_{\text{TRIS}} = 0,13$.

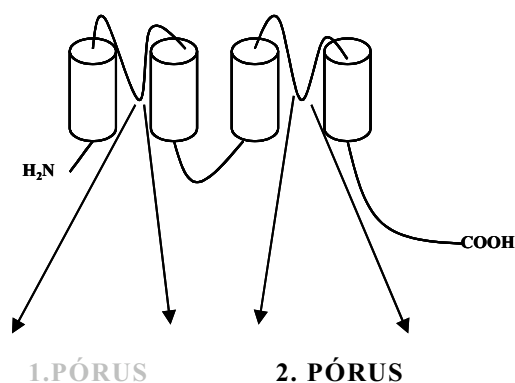
A Na^+ mentes extracelluláris oldattal elvégzett kísérletek eredményei alátámasztják azon hipotézisünket, hogy a Na^+ ionok beáramlása felelős az E_{rev} megváltozásáért. A ΔE_{rev} nem zérus értéke arra utal, hogy valószínűleg a cTBAK-1 csatorna K^+ szelektivitása lecsökkent, párhuzamosan a Na^+ -permeabilitás emelkedésével.

IV.3.5 A *NORP* a szelektivitási szűrővel lép kölcsönhatásba

A K^+ csatornák egyik, rendkívül konzervatív szekvencia szakasza a pórus régió vagy P-régió, amely egyértelműen meghatározza a csatorna permeabilitási sajátosságait. A póruson belül található, egy mindössze négy aminosavból álló szekvenciariészlet, a GYGD, amely a szűkebb értelemben vett szelektivitási szűrőnek tekintenek (101). Chapmann és munkatársai *drk1* (Kv2.1) csatornákon kimutatták, hogy a GYGD szekvencián belül, a Y és az D helyzetben csak meghatározott aminosav-pár cserék eredményeznek funkcionális és K^+ szelektív tetramer fehérje struktúrákat (102). Továbbá a GFGN pórusszekvenciájú HERG csatornák esetében a *NORP* a cTBAK-1-gyel megegyező hatást hozott létre: az áram csúcstértékének csökkenése mellett a csatorna kapuzása és szelektivitása is megváltozott. Ezzel szemben a feszültség vezérelt K^+ csatornák *Shaker* családjába tartozó Kv1.1 esetében, mely GYGD szelektivitási szűrővel rendelkezik, nem tapasztaltak módosulást a szelektivitásban a *NORP* alkalmazása során, „csupán” egyszerű pórus-blokkolóként működött (84). E két utóbbi

tényre alapozva úgy véljük, hogy a *NORP*-csatorna kölcsönhatás a P-régió, szűkebben a szelektivitási szűrő aminosav oldalláncainak módosításán keresztül történik.

Az egér cTBAK-1 csatorna két pórus régiójában eltérő a szelektivitási szűrő szerkezete: az elsőt GYGH, míg a másodikat GFGD aminosavak alkotják (103). A PCR technika felhasználásával mindkettő szelektivitási szűrőben pontmutációt hoztunk létre, hogy felderíthessük a *NORP* és a csatorna között fellépő kölcsönhatást (12. ábra). Az első pórusban a 105. pozícióban lévő Y-t cseréltük le egy F-ra (később Y105F hivatkozom e fenotípusra), a másodikban a megfelelő helyzetben lévő (211-es pozíció) F-t mutáltattuk egy Y-ra (később csak F211Y). Az első pórus mutációja GFGH-GFGD, a másodiké GYGH-GYGD aminosav-sorrendű csatorna-alegységet eredményezett. Az így módon létrehozott két mutáns csatornagént kódoló cRNS-t *Xenopus* oocitába injektálva olyan csatorna populációk fejeződtek ki a sejtmembránban, melyek vagy a HERG (Y105F), vagy a Kv1.1 (F211Y) csatorna szelektivitását meghatározó aminosav szekvenciát tartalmazták.



12. ábra A vad-típusú (WT) és a mutáns csatornák pórusának elsődleges szerkezete.

A cTBAK-1 csatorna P-régióinak aminosav sorrendje látható, a GYGH és a GFGD szelektivitási motívumok ki vannak emelve. A mutált aminosavakat eltérő színnel és háttérrel jelenítettük meg.

Vad-típus

89 195
FAGSFYFAITVITTI **GYGH** AAA...FFQAYYYCFITLTTI **GFGD** YVA

Y105F mutáns

FAGSFYFAITVITTI **FGFH** AAA...FFQAYYYCFITLTTI **GFGD** YVA

F211Y mutáns

FAGSFYFAITVITTI **GYGH** AAA...FFQAYYYCFITLTTI **GYGD** YVA

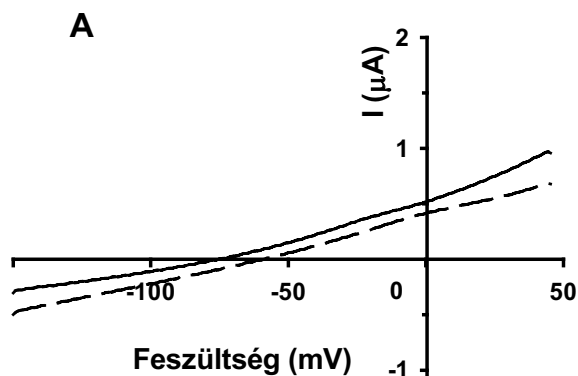
A 13. ábrán vad-típusú (WT: **A** része) és a mutáns (Y105F: **B** rész, F211Y: **C** része) csatornák teljes sejt árama látható 1 másodperc hosszú feszültség-rámpa impulzus során, ND-96 oldatban (folytonos vonal) és 250 μM *NORP* jelenlétében (szaggatott vonal). Az Y105F csatornák árama (13. ábra **B** része) elveszítette a kifelé egyenirányítását, az E_{rev} a depolarizáló membránpotenciál felé tolódott el, valamint a *NORP* gyakorlatilag nem volt hatással sem az áram nagyságára, sem pedig az E_{rev} -re.

A 13. ábra **C** része a másik mutáns cTBAK-1 csatornákon (Y211F) átfolyó teljes sejt áramot mutatja kontroll oldatban és 250 μM *NORP* hozzáadását követően. A *NORP* láthatóan alig módosítja az áram-feszültség görbét; a kicsi, azonban nem zérus változás oka a Kv1.1 csatornától eltérő pórusszerkezetben keresendő: a H jelenléte az első pórusban „elhangolja” a csatorna szelektivitást, ugyanis a Kv1.1 esetében a negatív töltésű D található ebben a helyzetben, amihez képest a pozitív töltésű oldallánc valószínűleg nagymértékű változást jelent (102). A ΔE_{rev} drasztikus csökkenése egyértelműen azt jelenti, hogy a *NORP* az Y pozíciójában lévő aminosavval való kölcsönhatása révén fejti ki szelektivitás módosító hatását.

Az 1.A táblázat összefoglalóan bemutatja a különböző csatorna típusok (WT, Y105F, F211Y) esetén, 250 μM *NORP* alkalmazása mellett mért MÁH és ΔE_{rel} értékeket. Az adatok statisztikai elemzése azt mutatta, hogy a 250 μM *NORP* hatása szignifikánsan kisebb volt a WT-hoz képest mind a MÁH, mind pedig a ΔE_{rel} tekintetében az F211Y mutánsnál ($p < 0,001$ és $p < 0,001$). A másik mutáns csatornatetramer (Y105F) esetében nem mutatjuk be a statisztikai vizsgálat eredményét, hiszen itt a hatás hiánya nyilvánvaló eredményre vezetne.

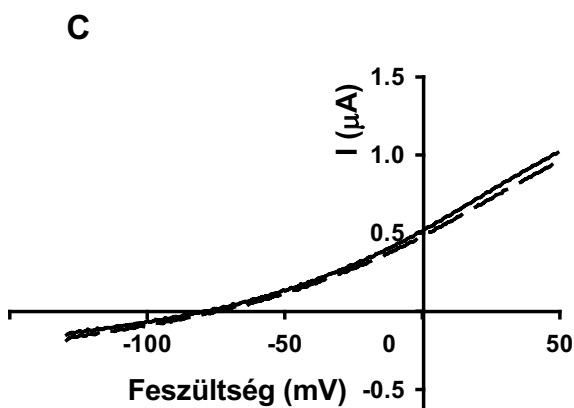
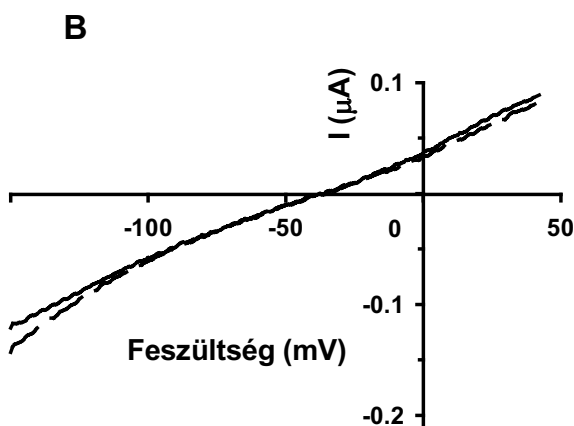
Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az első és a második pórus szelektivitási szűrőjében végrehajtott pontmutációk két teljesen eltérő csatorna-fenotípust hoztak

létre. A Y105F mutáns, feltételezhetően K^+ szelektivitása csökkenése miatt, *NORP* rezisztenciát mutatott, míg a F211Y konstrukció megtartotta K^+ konduktív képességét, és a *NORP* nem okozott olyan mértékű változást sem az áramamplitúdóban, sem a E_{rev} -ben, mint azt a vad-típusnál tapasztaltuk.



13. ábra A *NORP* hatása a mutáns csatornák áramára

(A) Vad-típusú (WT) cTBAK-1 csatornák árama ND-96 oldatban (folytonos vonal) és 250 μM *NORP* jelenlétében (szaggatott vonal). (Csak az illusztráció miatt jelenítettük meg.) (B) Az első pórusban létrehozott mutáció (Y105F) drámain megváltoztatta a cTBAK-1 alapvető sajátságait: a csatorna ionszelektivitása módosult (folytonos vonal), a *NORP* nem blokkolta a csatornán átfolyó áramot, s nem módosította a E_{rev} -et (szaggatott vonal). (C) Az F211Y mutáns tetramer biofizikai tulajdonságai megegyeznek a WT-ével (lásd 1. táblázat), kivéve, hogy 250 μM *NORP* hozzáadása mind az E_{rev} -t, mind az áramértéket kisebb mértékben befolyásolta.



IV.3.6 A Y105F mutáció módosítja a csatorna szelektivitását

Mint azt előzőleg kimutattuk, az első pórusban történt mutáció nagymértékben megváltoztatta a cTBAK-1 csatorna alapvető biofizikai sajátságait. Az izozmotikus ionhelyettesítés segítségével karakterizáltuk az összes csatornatípus elemi elektrofiziológiai tulajdonságait: az egyes csatorna típusokat kifejező sejteket ND-96,

HK és TRIS oldattal perfundáltattuk, az eltérő extracelluláris ionmiliőből adódó E_{rev} – vel vagy E_{rev} -ek különbségekkel jellemeztük a csatornafajták szelektivitását (lásd a 1. **B** táblázat szövegét).

Először a normál élettanihoz hasonló állapot esetén mérhető teljes-sejt áram feszültség függéséből határoztuk meg az áram megfordítási potenciálját ($E_{rev,ND-96}$, 1. **B** táblázat). A statisztikai analízis azt mutatta, hogy a WT és a F211Y mutáns $E_{rev,ND-96}$ -e azonos volt, szemben az Y105F-fel, amelynél a megfordítási potenciál a pozitív irányba tolódott el, jelezve a K^+ szelektivitás nagyfokú csökkenését, s valamilyen pozitív ion beáramlását. A HK és Na^+ mentes oldatban a WT és Y105F mért áram megfordítási potenciálok különbségei ($\Delta E_{rev,HK}, \Delta E_{rev,TRIS}$) csak alátámasztották azon feltételezésünket, miszerint a csatorna szelektivitási szűrője nem funkcionál, azaz „defektes”. A második pórus mutációja azonban nem okozott alapvető biofizikai sajátságokban ($\Delta E_{rev,HK}$) eltérő fenotípust ($p = 0,248$).

Csatorna típus	ΔE_{rel}	MÁH
WT	0.32 ± 0.04	0.64 ± 0.05
Y105F	-0.1 ± 0.03	1.09 ± 0.09
F211Y	0.1 ± 0.01	0.84 ± 0.02

Csatorna típus	$E_{rev,ND-96}(mV)$	$\Delta E_{rev,HK}(mV)$	$\Delta E_{rev,TRIS}(mV)$
WT	-71.1 ± 1.93	79.8 ± 3.8	3.3 ± 3.2
Y105F	-18.6 ± 7.3	34.9 ± 2.4	-18.6 ± 2.0
F211Y	-70.8 ± 2.4	73.5 ± 3.5	-

V. MEGBESZÉLÉS

V.1 A koleszterin hatása a Kv1.3 csatornák inaktivációs és aktivációs kapuzására

A koleszterin membránba történő bevitelének ill. onnan való kivonásának hatékonyságát két, egymástól független módszerrel ellenőriztük. A fluoreszcencia anizotrópia mérések eredményei azt mutatták, hogy a koleszterinszint M β CD/C-nel való emelését a membrán-mikroviszkozitás növekedése jellemezte, míg a hasonló koncentrációban alkalmazott M β CD-nek hanyagolható mértékű volt a hatása. Ha a M β CD-t nagyobb koncentrációban (5 mg/ml) alkalmaztuk, akkor a mikroviszkozitás szignifikánsan csökkent, viszont ekkor a teljes-sejt mérési konfiguráció kialakítása vált lehetetlenné a membrán nagyfokú roncsolódása miatt. Ezen ok miatt használtuk fel a sejtkapacitásra normált áramsűrűséget (ÁS), mint független paramétert, hogy mindkét kezelés hatékonyságát ellenőrizzük. Eredményeink, hasonlóan a korábbi irodalmi adatokhoz, azt igazolták, hogy a membrán koleszterinkoncentrációjának emelkedése csökkenti, csökkenése növeli az áramsűrűséget (40). Mindezek alapján úgy véljük, hogy mind a M β CD/C-nel, mind M β CD-nel kezelt sejtek esetében a kezelés effektív volt.

Kísérleteink során az aktiváció és inaktiváció kinetikai és egyensúlyi paramétereivel jellemeztük a koleszterin Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramára gyakorolt hatását. Eredményeinket az alábbiak szerint foglalhatjuk össze: (1) membrán megnövelt koleszterin-koncentrációja a Kv1.3 csatorna inaktivációjának lassulását, míg koleszterinszint csökkentése a gyorsulását eredményezte; (2) a koleszterin membránba történő bevitele lassította az aktivációt is, mely egyes sejtek esetében kétfázisúvá vált;

(3) egyensúlyi aktivációt jellemző meredekség és középpont koleszterin töltés hatására megváltozott, szemben az egyensúlyi inaktivációval.

Az egyensúlyi aktiváció feszültség függésének a depolarizáló potenciálok irányába történő eltolódása, legalábbis elméletileg, magyarázatot nyújthat a koleszterindúsított sejtek lassú aktivációs kinetikájára. Mivel a lassú vagy kétfázisú aktivációs kinetikát +50 mV tesztfeszültségek mellett mértük, abban a feszültségtartományban, ahol a G_N -V görbe a kontroll és a kezelt sejtek esetében gyakorlatilag azonos értéket vesz fel, a görbe eltolódása nem magyarázhatja a lassabb aktivációs kinetikát, ezért a tapasztalt lassulás a módosult Kv1.3 kapuzási kinetikának tudható be.

A feszültség vezérelt K^+ csatornák - köztük a Kv1.3 is - aktivációjáért az első négy, S1-S4 -helikális szegmensek felelősek, melyekről korábban kimutatták, hogy az S5-P-S6 régiót a környezettől elszigetelve, a membrán lipid molekulái által körülvéve helyezkednek el. (44; 45; 104) Következésképp, a sejtmembrán összetételének bármilyen módosítása közvetlenül kihat a csatorna zárt állapotból nyitott állapotba történő átmenetére. A membránviszkozitás megemelkedése az aktivációban résztvevő alegységek aminosav oldalláncai és a lipid molekulák apoláris szénláncai, valamint az -hélixek között fellépő „súrlódás” növekedését idézi elő, mely a csatornaaktiváció során végbemenő konformációs változást késlelteti. Eredményeink jó egyezést mutatnak K_{Ca} csatornákra, egy-csatorna szinten kapott eredményekkel: a depolarizáló feszültség értékeknél mért kisebb átlagos nyitvatartási időtartam és nyitási valószínűség koleszterin-bevitelkor, a makroszkópikus áramok szintjén lassúbb aktivációs kinetikát eredményezhet (41). Továbbá más típusú ioncsatornákon végzett hasonló kísérletek is azt mutatták, hogy a koleszterin membránbeli megemelt koncentrációja csökkenti a

csatornák nyitási frekvenciáját vagy aktivitását, amely a nyitott állapotban eltöltött időtartammal arányos (40; 43; 105; 106).

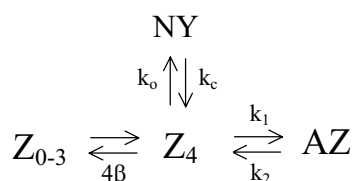
A Kv1.3 csatornák koleszterin bevitel hatására kialakult, újszerű kétfázisú aktivációja felveti azt a kérdést, hogy milyen modellel lehet leírni a tapasztalt jelenséget. A legnyilvánvalóbb válasz az lehet, ha feltételezzük, hogy a két Kv1.3 csatorna populáció van jelen a T sejtek membránjában, melyek eltérő lipid miliőben (különböző koleszterin tartalmú régiókban) helyezkednek el, mely egyúttal az aktiváció eltérő feszültség függését is eredményezi. Ha az egyensúlyi aktiváció eltolódásáért a lassan aktiválódó komponens megváltozott aktivációs kapuzása a felelős, akkor a depolarizáltabb feszültségek esetén azt várnánk, hogy a lassan aktiválódó csatornák hányada egyre kisebb. Ezzel szemben, az R paraméterre kapott eredményeink azt mutatják, hogy a két populáció aránya feszültség független, tehát ez a magyarázat nem állja meg a helyét teljes mértékben. Másrészt, a két csatornapopulációnak az áram inaktivációs kinetikájában is kétfázisú viselkedést kellene mutatnia. Az áram inaktivációs ága két komponensének a matematikai feloldása azonban csak bizonyos feltételek teljesülése mellett lehetséges: a két csatornafajtának az egymáshoz viszonyított aránya összemérhető legyen, valamint a két inaktivációs időállandó jelentősen különbözzön. Máskülönben annak ellenére, hogy két eltérő csatorna típus van jelen, a két komponens nem választható szét a görbe két-exponenciális függvényel történő illesztésekor (107).

Fentebb leírtak után egy másik, az előbbiektől teljesen eltérő javaslatot is teszünk a Kv1.3 kétfázisú aktivációjának magyarázatára: modellünk a Zagotta és mtsai. által, *Shaker A* típusú csatornára kidolgozott modellen alapul, melyet kibővítettünk a csatorna ún. aktivált zárt (AZ: aktivált-zárt állapot, 1. Diagram) állapotával (108).

Másodsorban az aktivációs sémánkban felhasználtuk az Anderson és mtsai. korábbi közleményét, melyben az MHC II fehérjék kétfázisú disszociációjának leírására egymástól teljesen eltérő állapotdiagram sémákat dolgoztak ki és modelleztek le (107). Elképzeléseink szerint az AZ állapot megjelenése annak tulajdonítható, hogy k_1 és k_2 sebességi állandók (lásd az 1. diagramot) a membrán viszkozitásának növekedése következtében módosulnak. A megváltozott k_1/k_2 arány miatt válik ez az állapot „láthatóvá”, holott normál élettani körülmények között is jelen van. Tehát az állapot diagram első négy „lépése” az inaktivációból visszatért egyes alegység, zárt állapotba történő átmenetét foglalja magában (Z_0 - Z_4), melyet a csatorna aktivált állapota (O) vagy éppen az aktivált-zárt állapota (AZ) követ. Az AZ állapotban a csatorna négy alegysége bekerül egy zárt, azonban konformációváltozást szenvedett, nem vezető állapotba, ahonnan csak a Z_4 –en keresztül juthat el a nyitott konfigurációba.

Még egy fontos kérdést kell tisztáznunk: miért nem kétfázisú az aktiváció minden egyes vizsgált sejt esetében? A T limfociták plazmamembránja, hiszen különböző donoroktól származnak, más és más koncentrációban tartalmazhat, és valószínűleg tartalmaz is, koleszterint, vagyis a M β CD/C kezeléseket követően is eltérő lesz az egyes sejtek membránjának koleszterintartalma. Feltételezésünk szerint az aktiváció két-exponenciális kinetikája csak megfelelő lipid-koleszterin arány fölött fordul elő, amikor is olyan fázisok keletkezhetnek, melyek fizikai és kémiai sajátságaikban eltérnek (109).

1. diagram



Mint azt a bevezetőben már említettük, a Kv1.3 csatorna S5-S6 szegmense, valamint a P régiója a C típusú inaktiváció során konformáció változást szenved (34; 81; 110; 111). Mivel az aktiváció és az inaktiváció csatolt folyamatok a Kv1.3-ban, így az aktivációs kapuzás befolyásolhatja az inaktivációt annak ellenére, hogy a csatornafehérje más és más régiója felelős ezekért az átalakulásokért. Mivel az S5-P-S6 szegmens a többi a szegmens által határolt, nem érintkezik a membránt alkotó lipid molekulákkal, ezért a membrán összetételében történő változásokat csak közvetett módon, az egyes α -hélixek között fellépő kölcsönhatáson keresztül érzékeli (45). Tulajdonképpen, az S5-S6 és az első négy szegmenst alkotó aminosavak oldalláncai között fellépő erősebb kölcsönhatás az, amely késlelteti az inaktivációt eredményező struktúra átalakulást.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a T limfociták membránjában történő koleszterinkoncentráció változás egyaránt módosítja a Kv1.3 csatorna feszültség- és időfüggő kapuzását. Azonban további kísérletek szükségesek annak kiderítésére vajon a Kv1.3 csatornák szubcelluláris kompartmenekben/raftokban találhatók-e meg.

V.2 Befolyásolja-e a negyedik diszulfid híd a Pi1 toxin hatékonyságát?

Összevetve a Pi1 11.4 nM-os félhatásos koncentrációját az általunk korábban karakterizált két másik PiV frakcióval (Pi2 és Pi3, a K_d 50 pM ill. 795 pM) szembeötlő, hogy a négy diszulfid híddal rendelkező Pi1 a legkevésbé hatékony gátlószer e három közül (92). Az említett toxinok a ChTx típusú peptid gátlók családjába tartoznak mind szerkezeti, mind pedig szekvencia homológia alapján (2. táblázat) (112). A proton

NMR vizsgálatok alapján elkészített háromdimenziós modell azt mutatta, hogy a Pi1 az aminosav szekvencia és a negyedik diszulfid híd miatti eltérések ellenére, a már ismert K^+ csatornablokkolókkal nagyon hasonló térbeli struktúrát mutat (ChTx, MgTx), így az 2. táblázatban bemutatott toxinok váza gyakorlatilag azonos. Tehát sem a szerkezetből adódó különbség, sem az extra szulfid híd nem befolyásolja a 24-es pozícióban levő lizin (K24; a ChTx-ban a K27) bekötődését a Kv1.3 csatorna pórusába, melyről igazolták, hogy létfontosságú a ChTx-csatorna komplex kialakításában és stabilizálásában. A Pi1 mégis alacsonyabb blokkolási hatásfoka valószínűleg az egyes aminosavak eltéréseivel és a nettó felületi töltés (surface charge) megváltozásával magyarázható. A 11-es helyzetű tirozin (Y) glicinre (G), valamint a 35-ös arginin (R) ciszteinre (C) történő „cseréje” lehet felelős a csökkent affinitásért, mivel a toxin-csatorna kötődés modellje azt mutatta, hogy ezen aminosavak kritikus szerepet játszanak a csatornapórusban található oldalláncokkal kialakuló kölcsönhatás létrehozásában. Ezenfelül a R35C változás a Pi1-ben a két PiV frakcióhoz képest egy nagy felületi töltésváltozást implikálhat: a pozitív töltésű arginin helyett egy negatív töltésű cisztein oldallánc építi fel a toxint.

2. táblázat A Pi1, Pi2, Pi3 és ChTx* elsődleges szerkezete

														**																					**		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
P1	L	V	K	C	R	G	T	S	D	C	G	R	P	C	Q	Q	Q	T	G	C	P	N	S	K	C	I	N	R	M	C	K	C	Y	G	C		
P2	T	I	S	C	T	N	P	K	Q	C	Y	P	H	C	K	K	E	T	G	Y	P	N	A	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	G	R		
P3	T	I	S	C	T	N	E	K	Q	C	Y	P	H	C	K	K	E	T	G	Y	P	N	A	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	G	R		
ChTx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
p	E	F	T	N	V	S	C	T	T	S	K	E	C	W	S	V	C	Q	R	L	H	N	T	S	R	G	K	C	M	N	K	K	C	R	C	Y	S

* Az egyes szekvenciák a legjobb szerkezetbeli azonosságot figyelembe véve vannak elrendezve.

** A negyedik diszulfid hidat alkotó ciszteinek a Pi1-ben

Eredményeinket összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a Pi1-ben meglevő negyedik, kiegészítő diszulfid híd nem befolyásolja a Kv1.3 csatornához történő kötődésének affinitását. A magasabb félhatásos koncentráció feltételezhető oka a 11. és a 35. helyzetben lévő, a toxin-csatorna komplex létrehozásában bizonyítottan jelentős szerepet játszó aminosavak eltérésének tudható be.

V.3 Gátlószer és mutagenesis indukált szelektivitásváltozás a cTBAK K^+ csatornában

Két nem peptid típusú, a humán medicinában alkalmazott vegyületről (fluoxetine és D-norpropoxyphene) kimutattuk, hogy gátolja a cTBAK-1 csatornák teljes-sejt áramát. A *FL*-nel és a *NORP*-nal végzett kísérleteink alapján a két vegyület az alábbiak szerint blokkolta a cTBAK-1 csatornák áramát:

- ✓ A *FL* egyaránt blokkolta a befelé és kifelé irányuló K^+ áramot, azonban a blokkolás mértéke eltérő volt, mely a gátlás feszültség jelzi.
- ✓ A *NORP* blokkolta a kifelé irányuló áramot, növelte a csatornákon átfolyó befelé folyó áramot, valamint megváltoztatta az áram megfordítási potenciálját.
- ✓ Na^+ mentes extracelluláris oldat alkalmazása igazolta, hogy a Na^+ ionok depolarizáló árama részt vesz a módosult E_{rev} kialakításában, azaz a csatorna szelektivitása megváltozott.
- ✓ A létrehozott pontmutációk segítségével kimutattuk, hogy a *NORP* a szelektivitási szűrőben elhelyezkedő aminosav-oldalláncok módosítása révén változtatja meg a cTBAK-1 szelektivitását.

- ✓ Ezenfelül a mutagenesis vizsgálatok olyan cTBAK-1 fenotípusokat állítottunk elő, amelyek hozzásegítenek a csatorna-gátlószer kölcsönhatás, valamint a szelektivitási mechanizmus megértéséhez.

A két alkalmazott vegyület magas félhatásos koncentrációja felveti az aspecifikus hatás lehetőségét, azonban a mutagenesis vizsgálatok során előállított különböző fenotípusú konstrukciók alátámasztják a gátlószer specifikus effektust.

A *FL* csatorna gátló hatását számos natív és heterológ expressziós rendszerben végzett kísérlet támasztja alá (113-116). A cTBAK-1 csatornára kifejtett gátlóhatást, melyet *Xenopus laevis* oocitákban vizsgáltunk, az alábbiak jellemezték:

1. Mind a kifelé, mind a befelé folyó K^+ áramot blokkolta a fluoxetine, azonban eltérő hatásokkal.
2. A blokkolt áram visszatérése nem volt teljes, irreverzibilis gátlás alakult ki.
3. A áram-feszültség görbe nem mutatott változást az áram megfordítási potenciáljában.

Ezek a kísérleti tények a korábban, más ioncsatornák esetében tapasztaltakkal jó egyezést mutatnak, azaz a *FL* látszólag feszültség függő módon eltömíti a pórust, nem változtatva meg a csatorna szelektivitását. A gátlás irreverzibilis volta azt sugallja, hogy a *FL* a membránon keresztül a citoszólba diffundálva a csatorna belső, intracelluláris oldali szájadékába kötődik, egy valószínűleg eltérő affinitású kötőhelyhez; melyet a CHO sejtekben kifejezett Kv1.3 csatornák esetében is kimutattak inside-out mérési elrendezésben (115). Ez a feltételezés megmagyarázza a blokkolás látszólagos feszültség függését is: a csatornán keresztül befelé áramló K^+ ionok a pórusban elhelyezkedő csatorna-fluoxetine komplexet destabilizálják, így látszólag magasabb megmaradó áramhányadot kapunk a mérések során. Az intracelluláris oldalon lévő *FL*

kötőhely meglétét a meglehetősen lassú bemosódási kinetika is alátámasztja: a molekula csak bizonyos idő eltelte után fejti ki hatását. Ezen kísérletsorozatban a *FL* nagyon hasznos „segédeszköznek” bizonyult, minthogy a *NORP* specifikus hatását segítségével szemléltetni tudtuk.

A *NORP* akciós potenciálra és ionáramokra gyakorolt hatását emlős ideg- és szívizomsejteken (kutya Purkinje rostok, GH3 sejtek) tanulmányozva azt találták, hogy a Na^+ ionok depolarizáló árama mellett, a K^+ áram is gátlódott *NORP* hozzáadásakor (117; 118). Ulens és munkatársai a közelmúltban mutatták ki, hogy *NORP* a HERG csatornák szelektivitásának és kapuzási kinetikájának megváltozását eredményezte, míg a Kv1.1 csatornák esetében nem tapasztaltak hasonló jelenséget (119). Mivel a cTBAK-1 csatorna szelektivitási szűrője két GYGH és két GFGD aminosav szekvenciát foglal magában - amely tekinthető egyfajta átmenetnek a HERG (GFGN) és a Kv1.1 (GYGD) csatornák megfelelő régiója között - arra utal, hogy a HERG csatornáknál látott jelenséghez hasonlót figyelhetünk meg a cTBAK-1 csatornák esetében is, vagyis a teljes-sejt áram gátlásán túl, a csatorna-szelektivitás változását várjuk. Mivel a cTBAK-1 csatorna nem inaktiválódik, így feszültség rámpa protokollt alkalmazva, majd a feszültség-áram görbék felhasználásával az E_{rev} és MÁH mennyiségekkel jellemeztük a *NORP* hatását, melyek dózisfüggését 122.1 μM és 167.8 μM félhatásos koncentráció írta le. A kifelé folyó áramok nem tökéletes gátlása kétféleképpen magyarázható:

1. Az oocita membránjában két eltérő farmakológiai tulajdonságú csatorna van jelen, eltérő *NORP* érzékenységgel.
2. A *NORP* megváltoztatja a csatorna „kapuzását”, vagy egyéb intrinszc tulajdonságát.

A két fenti érv közül az első egyértelműen kizárható, mivel a nem injektált oocitákból származó ionáramokat nem befolyásolta a külső oldatban lévő *NORP*; az utóbbit viszont a feszültség-áram görbék egyértelműen jelzik az áram megfordulási potenciáljának eltolódása révén: a *NORP* az áram blokkolásán túl a cTBAK-1 csatorna szelektivitását is módosította. Ugyan az E_{rev} eltolódása 250 μM *NORP* esetén nem volt olyan mértékű, mint a HERG csatornáknál (megközelítőleg annak az 50%-a), az ion-helyettesítési kísérletek (TRIS oldat alkalmazása) alátámasztották, hogy a cTBAK-1 esetében is a pórus Na^+ ion permeabilitása nőtt meg a K^+ ionéhoz viszonyítva, a *NORP* hozzáadásakor. A *NORP* koncentráció függő hatását megvizsgáltuk Na-mentes extracelluláris oldatban, s lényegesen alacsonyabb EC_{50} és IC_{50} értékeket adódtak az adatpontok illesztése során (61 μM illetve 38.4 μM), mint normál oldat esetében. Ezt a látszólag nagyobb affinitást a Na^+ ionok ND-96 oldatban fellépő, befelé áramlása magyarázza, mely a *NORP*-csatorna komplex kialakulását és stabilitását gátolja, míg az alacsonyabb blokkolt áramhányad utal arra, hogy a Na^+ depolarizáló árama is hozzájárult a +50 mV-nál az áramamplitúdó csökkenéséhez. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a *NORP* „szelektivitás-módosítóként” hatott a cTBAK-1-re: a csatorna nagymértékben inszelektívvé vált, mely a Na^+ ion K^+ -hoz viszonyított megnövekedett permeabilitásának az eredménye.

A csatorna struktúra-funkció vizsgálata során, hogy a *NORP* okozta szelektivitás módosulás esetleges okát megtaláljuk, a cTBAK-1 első és második pórusába mutációt vittünk be: először az első pórus megfelelő Y-ját cseréltük ki egy F-ra (Y105F), majd a második pórusban, a 211-es helyzetben lévő F-t mutáltattuk Y-ra (F211Y). Az első mutáns csatorna a HERG csatornák szelektivitási filteréhez hasonló, míg az utóbbi a Kv1.1 K^+ csatorna szelektivitásért felelős szekvenciáját hivatott utánózni. A legfőbb érv

ezen mutációk kiválasztásakor annak az ismerete volt, hogy a négy szomszédos alegység szelektivitási filterének kölcsönhatása határozza meg a csatornák permeabilitási tulajdonságait, valamint, hogy elsődlegesen a Y-D aminosavak közti kölcsönhatás az, ami feltehetően felelős a K^+ csatorna szelektivitásért (102; 120; 121). A Y pozíciójában lévő bármely aminosav, kivéve a fenilalanint, csökkenti a K^+ és Na^+ permeabilitási állandók hányadosának értékét, vagy nem funkcionáló csatorna konstrukciót eredményez; a D helyzetű mutációk kompenzálják a szelektivitás csökkenést, ezenfelül ez az aminosav határozza meg a csatorna egyenirányítását mind makroszkópikus, mind mikroszkópikus (egyedi csatorna) szinten, valamint a nagyméretű, egyértékű kationok póruson való áthaladását is megakadályozza.

Tehát a kifelé egyenirányítás megszűnése, a pozitívabb E_{rev} érték ND-96 oldatban és a kisebb E_{rev} eltolódás HK oldat perfúziójakor mind azt jelezheti, hogy a Y105F csatorna elveszítette K^+ „szelektáló” képességét. Ezen feltételezést csak tovább erősíti a Na^+ -mentes oldatban végzett kísérletek eredménye is: a Na^+ és K^+ ionok áramának együttese alakítja ki az Y105F mutáns csatornákon átfolyó áram tulajdonságait. Ezek alapján azt állapíthatjuk meg, hogy az első pórus GYGH szekvenciájában történt Y-F mutáció olyan tetramer csatornát eredményezett, mely nem képes K^+ vezető pórust létrehozni. A 250 μM *NORP* hatásának elmaradása annak tulajdonítható, hogy a csatorna mutáció következtében amúgy is redukálódott K^+ szelektivitása miatt a *NORP* nem képes további csökkenést előidézni a K^+ és Na^+ permeabilitási állandók arányában, azaz a *NORP* csatornába történő bekötődése nem módosítja az E_{rev} -et.

Felmerül a kérdés, hogy a Y F-re történő mutációja miért nem vezetett K^+ szelektív csatorna expressziójához, ha a KAT1 csatornák esetében nem okozott e

tekintetben semmiféle változást? A különféle K^+ csatorna mutánsokkal végzett kísérletek, valamint a már klónozott csatornák pórus régióinak összevetése alapján azt feltételezzük, hogy a GYGD szekvenciában, a D pozícióban csak olyan aminosavak eredményeznek K^+ szelektív konstrukciót, amikor is az adott helyzetű aminosav semleges vagy negatív töltésű (pl. D, N, T), feltéve, hogy a tirozin helyzetében egy fenilalanin található (102; 120; 121). A Y105F mutánsunk esetében egy hisztidin található az aszpartát pozíciójában, mely oly módon befolyásolja a szelektivitási filter és a csatorna extracelluláris pórusában elhelyezkedő aminosavak oldalláncokat, hogy ezáltal a magas affinitású K^+ kötőhelyek módosulnak.

Az előzőekkel ellentétben, a második pórusbeli mutáció (F211Y) olyan csatornadimert eredményezett, amely alapvető elektrofiziológiai tulajdonságai a WT-val megegyeztek, viszont a *NORP* érzékenysége szignifikánsan lecsökkent. A mutáció után, a membránban összeszerelődött csatorna, eltekintve a két 107-es helyzetű H-től, a Kv1.1-gyel azonos szelektivitási szűrővel rendelkezik. A F Y-ra való kicserélése, mely valójában csak egyetlen, OH csoportbeli különbséget jelent, észrevehető módon nem befolyásolta a cTBAK-1 szelektivitását, viszont a D helyzetében lévő két, nettó pozitív töltéssel bíró H (szemben a negatív D-vel) valószínűleg módosítja az oldalláncok *NORP*-nal való kölcsönhatását, amely megmagyarázhatja az E_{rev} eltolódást 250 μM *NORP* alkalmazása esetén. Természetesen további mutagenézis vizsgálatok elvégzése lenne szükséges ahhoz, hogy az egyes pozícióban elhelyezkedő aminosavak pontos szerepét tisztázhassuk, esetleg olyan chimerák előállítása lenne a célravezető, melyek a HERG vagy/és a Kv1.1 csatorna pórus régióját foglalná magában.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a mutagenézis eszközeivel élve két olyan cTBAK-1 fenotípust sikerült megalkotnunk, melyek hozzájárulnak a pórus szelektivitási

mechanizmusának, valamint a csatorna-gátlószer kölcsönhatásnak a megértéséhez. Eddigi ismereteink szerint nem sikerült olyan vegyületet találni, amely valamely kétpórusú csatorna szelektivitását változtatná meg.

VI. Összefoglalás

1. Kimutattuk, hogy a T limfociták domináns, feszültség vezérelt K^+ csatornájának (Kv1.3) egyensúlyi és kinetikai paramétereit módosítja a plazmamembrán koleszterintartalmának változtatása. Az aktiváció és az inaktiváció is lelassul a koleszterin bevitel hatására, míg annak csökkentése biológiai relevanciával nem bír. Ezenfelül a koleszterinszint emelése az aktiváció kétfázisú viselkedését eredményezte. A javasolt modellünk szerint a sebességi állandók arányának változása miatt, egy ún. aktivált-zárt állapot megjelenése tehető felelőssé az aktiváció efféle megváltozásáért. Azonban további kísérletek szükségesek annak kiderítésére, vajon a Kv1.3 csatornák szubcelluláris kompartmenekben/raftokban találhatók-e meg.
2. A *Pandinus imperator* venomjából izolált Pi1 frakció eltér a klasszikusnak mondható toxinok struktúrájától: négy diszulfid híd biztosítja stabilitását. Kimutattuk, hogy e család korábban vizsgált tagjaihoz viszonyítva (Pi2 és Pi3) a Pi1 toxin a legkevésbé hatékony gátlószere a Kv1.3 csatornának, **de** a negyedik diszulfid híd nem befolyásolja a kötődés affinitását. A kisebb gátlási hatékonyság oka 11. és a 35. pozícióban levő, a toxin-csatorna komplex kialakításában fontos szerepet játszó aminosavakban való eltérésnek tulajdonítható.
3. A mutagenézis eszközeivel élve két olyan cTBAK-1 fenotípust sikerült megalkotnunk, melyek hozzájárulnak a pórusselektivitás mechanizmusának, valamint a csatorna-gátlószer kölcsönhatásnak a megértéséhez. Eddigi ismereteink szerint nem sikerült olyan vegyületet találni, amely valamely kétpórusú csatorna szelektivitását változtatná meg.

VII. Summary

- 1 We demonstrated that the modification of the cholesterol content in the T lymphocyte membrane altered the kinetic and steady-state parameters of the gating of Kv1.3. The activation and inactivation slows upon increase of the cholesterol content, while the depletion of cholesterol from the plasma membrane does not have significant effect on either. Furthermore, the elevation of cholesterol level resulted in the biphasic activation of Kv1.3 current. We proposed a model that explains the biphasic activation with the visibility of an activated-closed state due to the change in rate constants. Further experiments are necessary to reveal the physiological relevance of our findings, especially, the possibility of compartmentalization of Kv1.3 in lipid rafts.
- 2 Pi1, a toxin purified from the venom of *Pandinus imperator* is stabilized by four disulfide bridges. We showed that the fourth disulphide bridge in Pi1 does not influence the binding ability of the toxin to the Kv1.3 channels in human T lymphocytes. The less effective Kv1.3 block by Pi1 compared to Pi2 and Pi3 is due to differences in amino acid side chain properties at positions 11 and 35, both of them play crucial role in the formation of channel-toxin complex.
- 3 We have taken advantage of the specific manner of action of two drugs used in human medicine (fluoxetine and D-norpropoxyphene), to produce different phenotypes of the cloned 2-pore mcTBAK-1 K⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. To date, and to our knowledge, no drugs have been reported that could modify the selectivity of this emerging family of leak K⁺ channels. Based on a pharmacological approach on the one hand, on a mutagenesis study on the other hand, this work also highlights the significance of the crucially important GYGD sequence in this family of 2-P channels.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Goldstein, S.A., K.W. Wang, N. Ilan, and M.H. Pausch. 1998. Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J Mol.Med.* 76:13-20.
2. Biggin, P.C., T. Roosild, and S. Choe. 2000. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr.Opin.Struct.Biol* 10:456-461.
3. Deutsch, C. and S.C. Lee. 1988. Cell volume regulation in lymphocytes. *Renal Physiol.Biochem.* 11:260-276.
4. Cahalan MD, Wulff H, and Chandy G. 2002. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol* 21:235-252.
5. Coetzee, W.A., Y. Amarillo, J. Chiu, A. Chow, D. Lau, T. McCormack, H. Moreno, M.S. Nadal, A. Ozaita, D. Pountney, M. Saganich, d.M. Vega-Saenz, and B. Rudy. 1999. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:233-285.
6. Lesage, F. and M. Lazdunski. 2000. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am.J Physiol Renal Physiol* 279:F793-F801
7. Imboden, J.B. and J.D. Stobo. 1985. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. *J.Exp.Med.* 161:446-456.
8. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy. 1997. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr.Opin.Biotechnol.* 8:749-756.
9. Matkó, J., J. Szöllösi, L. Trón, and S. Damjanovich. 1988. Luminescence spectroscopic approaches of cell surface dynamics. *Quart.Rev.Biophys.* 21:479-544.

10. Cahalan, M.D. and R.S. Lewis. 1990. Functional roles of ion channels in lymphocytes. *Semin.Immunol.* 2:107-117.
11. Grissmer, S., B. Dethlefs, J.J. Wasmuth, A.L. Goldin, G.A. Gutman, M.D. Cahalan, and K.G. Chandy. 1990. Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:9411-9415.
12. Lewis, R.S. and M.D. Cahalan. 1990. Ion channels and signal transduction in lymphocytes. *Annu.Rev.Physiol.* 52:415-430.
13. Gallin, E.K. 1991. Ion channels in leukocytes. *Physiol.Rev.* 71:775-811.
14. Matteson, D.R. and C. Deutsch. 1984. K⁺ channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307:468-471.
15. Decoursey, T.E., K.G. Chandy, S. Gupta, and M.D. Cahalan. 1984. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307:465-468.
16. Lewis, R.S. and M.D. Cahalan. 1988. Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes. *Science* 239:771-775.
17. Cahalan, M.D., K.G. Chandy, T.E. Decoursey, and S. Gupta. 1985. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J.Physiol.(Lond)* 358:197-237.
18. Grissmer, S., M.D. Cahalan, and K.G. Chandy. 1988. Abundant expression of type I K⁺ channels. A marker for lymphoproliferative diseases? *J.Immunol.* 141:1137-1142.
19. Shapiro, M.S. and T.E. Decoursey. 1988. Two types of potassium channels in a lymphoma cell line. *Biophys.J.* 53:550a Abstract.
20. Leonard, R.J., M.L. Garcia, R.S. Slaughter, and J.P. Reuben. 1992. Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes:

mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89:10094-10098.

21. Price, M., S.C. Lee, and C. Deutsch. 1989. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:10171-10175.
22. Chandy, K.G., T.E. Decoursey, M.D. Cahalan, C. McLaughlin, and S. Gupta. 1984. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* 160:369-385.
23. Freedman, B.D., M. Price, and C. Deutsch. 1992. Evidence for voltage modulation of IL2 production by human blood lymphocytes. *J.Immunol.* 149:3784-3794.
24. Wilson, H.A. and T.M. Chused. 1985. Lymphocyte membrane potential and Ca^{2+} -sensitive potassium channels described by oxonol dye fluorescence measurements. *J.Cell Physiol.* 125:72-81.
25. Grinstein, S. and J.D. Smith. 1990. Calcium-independent cell volume regulation in human T lymphocytes. Inhibition by charybdotoxin. *J.Gen.Physiol.* 95:97-120.
26. Chandy, K.G., J. Douglass, G.A. Gutman, L.Y. Jan, R. Joho, L. Kaczmarek, D. McKinnon, R.A. North, S. Numa, L. Philipson, A.B. Ribera, B. Rudy, L. Salkoff, R.A. Swanson, D. Steiner, M.A. Tanouye, and B.L. Temple. 1991. A simplified gene nomenclature. *Nature* 352:26-26.
27. MacKinnon, R. 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235.
28. Hille, B. 1992. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

29. Ledwell, J.L. and R.W. Aldrich. 1999. Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J Gen* 113:389-414.
30. Demo, S.D. and G. Yellen. 1991. The inactivation gate of the Shaker K⁺ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* 7:743-753.
31. Zagotta, W.N., T. Hoshi, and R.W. Aldrich. 1990. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB [see comments]. *Science* 250:568-571.
32. López-Barneo, J., T. Hoshi, S.H. Heinemann, and R.W. Aldrich. 1993. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors and Channels* 1:61-71.
33. Panyi, G., Z.-F. Sheng, L.-W. Tu, and C. Deutsch. 1995. C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys.J.* 69:896-904.
34. Yellen, G., D. Sodickson, T.-Y. Chen, and M.E. Jurman. 1994. An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys.J.* 66:1068-1075.
35. Starkus, J.G., L. Kuschel, M.D. Rayner, and S.H. Heinemann. 1998. Macroscopic Na⁺ Currents in the "Nonconducting" *Shaker* Potassium Channel Mutant W434F. *J.Gen.Physiol.* 112:85-93.
36. Singer, S.J. and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. 175:720-731.
37. Frye, L.D. and M. Edidin. 1970. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* 7:319-335.

38. Fong, T.M. and M.G. McNamee. 1986. Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* 25:830-840.
39. Yeagle, P.L., J. Young, and D. Rice. 1988. Effects of cholesterol on (Na⁺,K⁺)-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* 27:6449-6452.
40. Levitan, I., A.E. Christian, T.N. Tulenko, and G.H. Rothblat. 2000. Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *J Gen Physiol* 115:405-416.
41. Bolotina, V., V. Omelyanenko, B. Heyes, U. Ryan, and P. Bregestovski. 1989. Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca²⁺(+)-dependent K⁺ channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 415:262-268.
42. Chang, H.M., R. Reitstetter, and R. Gruener. 1995. Lipid-ion channel interactions: increasing phospholipid headgroup size but not ordering acyl chains alters reconstituted channel behavior. *J Membr.Biol.* 145:13-19.
43. Chang, H.M., R. Reitstetter, R.P. Mason, and R. Gruener. 1995. Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J Membr.Biol.* 143:51-63.
44. Monks, S.A., D.J. Needleman, and C. Miller. 1999. Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the Shaker K⁺ channel. *J.Gen.Physiol.* 113:415-423.
45. Hong, K.H. and C. Miller. 2000. The lipid-protein interface of a Shaker K(+) channel. *J.Gen.Physiol.* 115:51-58.

46. Li-Smerin, Y., D.H. Hackos, and K.J. Swartz. 2000. alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J.Gen.Physiol.* 115:33-50.
47. Martens, J.R., R. Navarro-Polanco, E.A. Coppock, A. Nishiyama, L. Parshley, T.D. Grobaski, and M.M. Tamkun. 2000. Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J.Biol.Chem.* 275:7443-7446.
48. Martens, J.R., N. Sakamoto, S.A. Sullivan, T.D. Grobaski, and M.M. Tamkun. 2001. 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.
49. Millar, J.A., L. Barratt, A.P. Southan, K.M. Page, R.E. Fyffe, B. Robertson, and A. Mathie. 2000. A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:3614-3618.
50. Duprat, F., F. Lesage, M. Fink, R. Reyes, C. Heurteaux, and M. Lazdunski. 1997. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 16:5464-5471.
51. Fink, M., F. Lesage, F. Duprat, C. Heurteaux, R. Reyes, M. Fosset, and M. Lazdunski. 1998. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17:3297-3308.
52. Lesage, F., E. Guillemare, M. Fink, F. Duprat, M. Lazdunski, G. Romey, and J. Barhanin. 1996. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* 15:1004-1011.
53. Patel, A.J., E. Honore, F. Lesage, M. Fink, G. Romey, and M. Lazdunski. 1999. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat.Neurosci.* 2:422-426.

54. Lesage, F., F. Maingret, and M. Lazdunski. 2000. Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett.* 471:137-140.
55. Lesage, F., C. Terrenoire, G. Romey, and M. Lazdunski. 2000. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275:28398-28405.
56. Maingret, F., M. Fosset, F. Lesage, M. Lazdunski, and E. Honore. 1999. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem* 274:1381-1387.
57. Maingret, F., I. Lauritzen, A.J. Patel, C. Heurteaux, R. Reyes, F. Lesage, M. Lazdunski, and E. Honore. 2000. TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J* 19:2483-2491.
58. Maingret, F., A.J. Patel, F. Lesage, M. Lazdunski, and E. Honore. 2000. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275:10128-10133.
59. Lesage, F., R. Reyes, M. Fink, F. Duprat, E. Guillemare, and M. Lazdunski. 1996. Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J* 15:6400-6407.
60. Czirjak G. and Enyedi P. 2002. Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* 277:5426-5432.
61. Kim, D., A. Fujita, Y. Horio, and Y. Kurachi. 1998. Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K⁺ channel (cTBAK-1). *Circ.Res.* 82:513-518.

62. Kim, Y., H. Bang, and D. Kim. 1999. TBAK-1 and TASK-1, two-pore K(+) channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am.J Physiol* 277:H1669-H1678
63. Rajan, S., E. Wischmeyer, G. Xin-Liu, R. Preisig-Muller, J. Daut, A. Karschin, and C. Derst. 2000. TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* 275:16650-16657.
64. Maingret, F., A.J. Patel, M. Lazdunski, and E. Honore. 2001. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J* 20:47-54.
65. Czirjak, G., T. Fischer, A. Spat, F. Lesage, and P. Enyedi. 2000. TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol.Endocrinol.* 14:863-874.
66. Brickley, S.G., V. Revilla, S.G. Cull-Candy, W. Wisden, and M. Farrant. 2001. Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409:88-92.
67. Medhurst, A.D., G. Rennie, C.G. Chapman, H. Meadows, M.D. Duckworth, R.E. Kelsell, I.I. Gloger, and M.N. Pangalos. 2001. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 86:101-114.
68. Sirois, J.E., Q. Lei, E.M. Talley, C. Lynch, and D.A. Bayliss. 2000. The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci.* 20:6347-6354.
69. Duprat, F., F. Lesage, A.J. Patel, M. Fink, G. Romey, and M. Lazdunski. 2000. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol.Pharmacol.* 57:906-912.

70. Buckler, K.J., B.A. Williams, and E. Honore. 2000. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* 525 Pt 1 135-42:-42
71. Rochat, H., P. Bernard, and F. Couraud. 1979. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In *Advances in Cytopharmacology*. B. Cerrarelli and F. Clementi, editors. Raven Press, New York. 325-334.
72. Sands, S.B., R.S. Lewis, and M.D. Cahalan. 1989. Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. *J.Gen.Physiol.* 93:1061-1074.
73. Novick, J., R.J. Leonard, V.F. King, W. Schmalhofer, G.J. Kaczorowski, and M.L. Garcia. 1991. Purification and characterization of two novel peptidyl toxins directed against K⁺ channels from venom of new world scorpions. *Biophys.J.* 59:78a Abstract.
74. Park, C.S. and C. Miller. 1992. Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* 31:7749-7755.
75. Gross, A. and C. Miller. 1996. Agitoxin footprinting the *Shaker* potassium channel pore. *Neuron* 16:399-406.
76. Stocker, M. and C. Miller. 1994. Electrostatic distance geometry in a K⁺ channel vestibule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:9509-9513.
77. Goldstein, S.A., D.J. Pheasant, and C. Miller. 1994. The Charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12:1377-1388.
78. Swartz, K.J. and R. MacKinnon. 1995. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* 15:941-949.

79. Swartz, K.J. and R. MacKinnon. 1997. Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* 18:665-673.
80. Swartz, K.J. and R. MacKinnon. 1997. Mapping the receptor site for Hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. *Neuron* 18:675-682.
81. Choi, K.L., R.W. Aldrich, and G. Yellen. 1991. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:5092-5095.
82. Grissmer, S. and M.D. Cahalan. 1989. TEA prevents inactivation while blocking open K⁺ channels in human T lymphocytes. *Biophys.J.* 55:203-206.
83. Yellen, G., M.E. Jurman, T. Abramson, and R. MacKinnon. 1991. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 251:939-942.
84. Ulens, C., P. Daenens, and J. Tytgat. 1999. Norpropoxyphene-induced cardiotoxicity is associated with changes in ion-selectivity and gating of HERG currents. *Cardiovasc.Res.* 44:568-578.
85. Bental, M. and C. Deutsch. 1993. Metabolic changes in activated T cells: An NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magn.Reson.Med.* 29:317
86. Deutsch, C., D. Krause, and S.C. Lee. 1986. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J.Physiol.(Lond)* 372:405-423.
87. Deutsch, C., M. Price, S. Lee, V.F. King, and M.L. Garcia. 1991. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in human T lymphocytes. Evidence for association with the voltage-gated K⁺ channel. *J.Biol.Chem.* 266:3668-3674.

88. Liman, E.R., J. Tytgat, and P. Hess. 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861-871.
89. Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.
90. Gomez-Lagunas, F., T. Olamendi-Portugal, F.Z. Zamudio, and L.D. Possani. 1996. Two novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino acid sequence is important for their affinities towards *Shaker* B K⁺ channels. *J.Membr.Biol.* 152:49-56.
91. Peter, M., Z. Varga, G. Panyi, L. Bene, S. Damjanovich, C. Pieri, L.D. Possani, and R. Gaspar. 1998. Pandinus imperator scorpion venom blocks voltage-gated K⁺ channels in human lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 242:621-625.
92. Peter, M.J., Z. Varga, P. Hajdu, R.J. Gaspar, S. Damjanovich, E. Horjales, L.D. Possani, and G. Panyi. 2001. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr.Biol* 179:13-25.
93. Choi, J.S., S.J. Hahn, D.J. Rhie, S.H. Yoon, Y.H. Jo, and M.S. Kim. 1999. Mechanism of fluoxetine block of cloned voltage-activated potassium channel Kv1.3. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 291:1-6.
94. Yeung, S.Y., J.A. Millar, and A. Mathie. 1999. Inhibition of neuronal KV potassium currents by the antidepressant drug, fluoxetine. *Br.J Pharmacol.* 128:1609-1615.
95. Deak, F., B. Lasztocki, P. Pacher, G.L. Petheo, K. Valeria, and A. Spat. 2000. Inhibition of voltage-gated calcium channels by fluoxetine in rat hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology* 39:1029-1036.

96. Maertens, C., L. Wei, T. Voets, G. Droogmans, and B. Nilius. 1999. Block by fluoxetine of volume-regulated anion channels. *Br.J Pharmacol.* 126:508-514.
97. Fuller, R.W. and D.T. Wong. 1977. Inhibition of serotonin reuptake. *Fed Proc* 36:2154-2158.
98. Horrigan, F.T. and W.F. Gilly. 1996. Methadone block of K⁺ current in squid giant fiber lobe neuron. *J Gen Physiol* 107:243-260.
99. Holland, D.R. and M.I. Steinberg. 1979. Electrophysiologic properties of propoxyphene and norpropoxyphene in canine cardiac conducting tissues in vitro and in vivo. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 47:123-133.
100. Tanaka, A. and T. Tokimasa. 1999. Theoretical background for inward rectification. *Tokai J Exp Clin Med* 24:147-153.
101. Doyle, D.A., J. Morais-Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
102. Chapman, M.L., H.S. Krovetz, and A.M. VanDongen. 2001. GYGD pore motifs in neighbouring potassium channel subunits interact to determine ion selectivity. *J Physiol* 530:21-33.
103. Kim, D., A. Fujita, Y. Horio, and Y. Kurachi. 1998. Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K⁺ channel (cTBAK-1). *Circ.Res.* 82:513-518.
104. Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80:555-592.
105. Lundbaek, J.A., P. Birn, J. Girshman, A.J. Hansen, and O.S. Andersen. 1996. Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry* 35:3825-3830.

106. Jennings, L.J., Q.W. Xu, T.A. Firth, M.T. Nelson, and G.M. Mawe. 1999. Cholesterol inhibits spontaneous action potentials and calcium currents in guinea pig gallbladder smooth muscle. *Am.J Physiol* 277:G1017-G1026
107. Anderson, T.G. and H.M. McConnell. 1999. Interpretation of biphasic dissociation kinetics for isomeric class II major histocompatibility complex-peptide complexes. *Biophys J* 77:2451-2461.
108. Zagotta, W.N. and R.W. Aldrich. 1990. Voltage-dependent gating of *Shaker* A-type potassium channels in *Drosophila* muscle. *J.Gen.Physiol.* 95:29-60.
109. Radhakrishnan, A., T.G. Anderson, and H.M. McConnell. 2000. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12422-12427.
110. Ogielska, E.M., W.N. Zagotta, and R.W. Aldrich. 1994. The stoichiometry of C-type inactivation. *Biophys.J.* 66:A282 Abstract.
111. Liu, Y., M.E. Jurman, and G. Yellen. 1996. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* 16:859-867.
112. Tytgat, J., K.G. Chandy, M.L. Garcia, G.A. Gutman, M.F. Martin-Eauclaire, J.J. van der Walt, and L.D. Possani. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms; alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Science* 20:444-447.
113. Tytgat, J., C. Maertens, and P. Daenens. 1997. Effect of fluoxetine on a neuronal, voltage-dependent potassium channel (Kv1.1). *Br.J Pharmacol.* 122:1417-1424.
114. Deak, F., B. Lasztocki, P. Pacher, G.L. Petheo, K. Valeria, and A. Spat. 2000. Inhibition of voltage-gated calcium channels by fluoxetine in rat hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology* 39:1029-1036.

115. Choi, J.S., S.J. Hahn, D.J. Rhie, S.H. Yoon, Y.H. Jo, and M.S. Kim. 1999. Mechanism of fluoxetine block of cloned voltage-activated potassium channel Kv1.3. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 291:1-6.
116. Yeung, S.Y., J.A. Millar, and A. Mathie. 1999. Inhibition of neuronal KV potassium currents by the antidepressant drug, fluoxetine. *Br.J Pharmacol.* 128:1609-1615.
117. Holland, D.R. and M.I. Steinberg. 1979. Electrophysiologic properties of propoxyphene and norpropoxyphene in canine cardiac conducting tissues in vitro and in vivo. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 47:123-133.
118. Horrigan, F.T. and W.F. Gilly. 1996. Methadone block of K⁺ current in squid giant fiber lobe neuron. *J Gen Physiol* 107:243-260.
119. Ulens, C., P. Daenens, and J. Tytgat. 1999. Norpropoxyphene-induced cardiotoxicity is associated with changes in ion-selectivity and gating of HERG currents. *Cardiovasc.Res.* 44:568-578.
120. Nakamura, R.L., J.A. Anderson, and R.F. Gaber. 1997. Determination of key structural requirements of a K⁺ channel pore. *J Biol Chem* 272:1011-1018.
121. Lees-Miller, J.P., Y. Duan, G.Q. Teng, K. Thorstad, and H.J. Duff. 2000. Novel gain-of-function mechanism in K(+) channel-related long-QT syndrome: altered gating and selectivity in the HERG1 N629D mutant. *Circ.Res.* 86:507-513.

VIII.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Hajdú P., Varga Z., Pieri C., Panyi Gy., Gáspár R. Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. Pflügers Archives, European Journal of Physiology (közlésre elfogadva) **I.F.: 1,632**

Hajdú P., Ulens C., Panyi Gy., Tytgat J. Drug- and mutagenesis-induced changes in the selectivity filter of a cardiac 2-pore background K⁺ channel. Cardiovascular Research (közlésre beadva) **I.F.: 4,552**

Péter M., **Hajdú P.**, Varga Z., Damjanovich S., Possani L., Panyi Gy. Gáspár R. Block of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin. Biochemical and Biophysical Research Communications (2000); 278(1):34-37 **I.F.: 2,946**

VIII.2 Könyvfejezetek

Panyi Gy., Somodi S., Varga Z., **Hajdú P.**, Pieri C., Pandi-Perumal S.R., Damjanovich S., Gáspár R. Pharmacological effects of melatonin on ion channels. Chapter 27 in Pineal Gland and Melatonin, ed.: Chandana Haltar, Oxford & IBH Publishing Co. (könyvfejezet)

VIII.3Egyéb közlemények

Peter M., Varga Z., **Hajdú P.**, Gaspar R., Damjanovich S., Horjales E., Possani L.D., Panyi G. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. Journal of Membrane Biology (2001); 179(1): 13-25 **I.F.: 2,787**

C.V.F. Batista, F. Gómez-Lagunas, R.C. Rodríguez de la Vega, **P. Hajdu**, Gy. Panyi, R. Gáspár, L. D. Possani Two novel toxins from the Amzonean scorpion *Tytius*

cambridgei that block Kv1.3 and *Shaker* B K^+ -channels with distinctly different affinities Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2002 (közlésre elfogadva) **I.F.: 2,112**

Gurrola G., Zamudio F., **Hajdú P.**, Somodi S., Gáspár R., Possani L. Panyi Gy. Natural variants of scorpion toxin from *Centruroides noxius* specific for potassium channels sub-type Kv1.3 of human T lymphocytes. BBRC, 2002 (közlésre beadva) **I.F.: 2,946**

VIII.4 Megjelent absztraktok, előadások

Hajdú P., Gáspár R., Deutsch C. Panyi Gy. Equilibrium and kinetic parameters of recovery from inactivation in Kv1.3. (előadás) Magyar Biofizikai Társaság Ioncsatorna Szekciójának tudományos ülése: Molekuláris mechanizmusok a transzmembrán jelátvitelben. 1999. 07.13.

Hajdú P., Gáspár R., Deutsch C., Panyi Gy. Az inaktivációból történ visszatérés kinetikai és egyensúlyi paraméterei vad típusú és mutáns (A413V) Kv1.3 csatornákon a membránpotenciál függvényében (poszter). A Magyar Biofizikai Társaság Vándorgy lése, Kecskemét. 1999. augusztus 25.-28.

Hajdú P., Gáspár R., Deutsch C., Panyi Gy. Az inaktivációból történ visszatérés Kv1.3 K^+ csatornákon a membránpotenciál függvényében. (poszter) Membrántranszport konferencia, Sümeg, 2000. május 23.-26.

Hajdú P., Panyi Gy., Varga Z., Damjanovich S., Gaspar R. Modification of membrane cholesterol content alters the gating kinetics of Kv1.3. (poszter) Annual Meeting of Biophysical Society, Boston, MA, USA 2001. 02. 17-21.

Hajdú P., Panyi Gy., Varga Z., Damjanovich S., Gaspar R. Modification of membrane cholesterol content alters the gating kinetics of Kv1.3. (poszter) Magyar Biofizikai Társaság Vándorgy lése, Budapest, 2001. július 5-7.

Hajdú P., Ulens C., Panyi Gy., Tytgat J. Az egér CTBAK-1 K⁺ csatorna szelektivitásának norpropoxyphene indukált megváltozása. (poszter)
Membrántranszport konferencia, Sümeg, 2002. május 21.-24.

IX. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Gáspár Rezső egyetemi tanárnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának, amiért felkeltette érdeklődésemet a biofizika és az elektrofiziológia iránt, tanácsaival tudományos munkámat segítette, irányította.

Köszönettel tartozom Prof. Damjanovich Sándor akadémikus egyetemi tanárnak, az akadémiai munkacsoport vezetőjének, aki lehetővé tette számomra, hogy a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben kutatómunkát végezhsek, és hasznos tanácsaival mindig segítette munkámat.

Hálával tartozom Dr. Panyi György egyetemi docensnek, aki nagy szakmai tudásával és tapasztalatával mindvégig elősegítette tudományos fejlődésemet, szakmai kapcsolatai révén lehetővé tette számomra az elektrofiziológia más területeinek, valamint a biofizika egyéb módszereinek a megismerését.

Köszönetet mondok a patch-clamp laboratóriumban dolgozó és dolgozott munkatársaimnak, Dr. Varga Zoltánnak, Dr. Péter Mózesnek, Somodi Sándornak dr.-nak, Zsiros Emesének és Bagdány Miklósnak, akikkel mindig megfelelő hangulatot teremtettünk a munkához.

Külön köszönettel és tisztelettel tartozom Szentesi Gergelynének, Pásztorné Tóth Enikőnek, Őri Gabriellának, Nagy Ceciliának és Harangi Istvánnának a mérések előkészítésében nyújtott segítségükért. Ezenfelül köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet összes dolgozójának, akik értekezésem „életre hívásában” segítettek.

Ezúton köszönöm meg Prof. Jan Tytgatnak, a Leuveni Katolikus Egyetem Toxikológiai és Bromatológiai Laboratórium igazgatójának, hogy sikeres és gyümölcsöző hónapokat tölthettem el az általa vezetett laboratóriumban.

Végezetül, de kiemelten köszönöm szüleim biztatását és példamutatását, valamint feleségem türelmét és szerető támogatását.